



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



**SUPEROVULACIÓN DE VACAS DONANTES DE
EMBRIONES UTILIZANDO UNA O DOS APLICACIONES
DE HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE**

Andrés Tríbulo

Tesis
Para obtener el Grado Académico de
Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

Córdoba, 2015

**SUPEROVULACIÓN DE VACAS DONANTES DE EMBRIONES UTILIZANDO
UNA O DOS APLICACIONES DE HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE**

Andrés Tríbulo

Comisión Asesora de Tesis

Director: Med. Vet. (M.V.Sc., Ph.D.) Gabriel Bó

Asesores: Dra. Armonía Alonso

Dra. Dolores Moreno

Tribunal Examinador de Tesis

Presentación formal académica

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Gabriel A. Bó, por su gran colaboración y constante apoyo tanto en la realización de mi tesis como en mi formación profesional.

A mis padres, Ricardo y Manuela, por darme la posibilidad en primer lugar de estudiar lo que me apasiona y además, por guiarme en mi formación profesional y personal. Especialmente a mi padre, por ser mi gran maestro, por transmitirme todos sus conocimientos y estar siempre a mi lado brindándose para que progrese en mi carrera profesional.

A mi tío, Humberto Tríbulo por ser junto con mi padre uno de los pilares fundamentales de mi carrera y además, por estar siempre presente en cada uno de mis trabajos.

Al Dr. Ruben Mapletoft, por su colaboración en mi tesis. Persona a quién admiro por ser uno de los máximos exponentes en reproducción bovina a nivel mundial y tener la amabilidad y humildad de compartir sus conocimientos.

Al Dr. Dante Beltramo por estar siempre predispuesto en colaborar con mis trabajos de tesis proporcionándome información.

A la Dra Armonía Alonso y Dolores Moreno por ser parte de mi comisión asesora de tesis y darme su respaldo.

A Daniel Carballo Guerrero, Martín Ramos, Jahir Vicente Garzón, José María Oviedo, Ignacio Reano, José Silva, Luis Delgado y todos los pasantes del IRAC que colaboraron de alguna u otra manera para la realización de mis experimentos.

A mi hermana Paula, por brindarme su apoyo y ayudarme en la realización de los trabajos de mi tesis.

En especial a mi esposa, Carla por su incondicional apoyo para la realización de mi tesis, que sin ella no hubiese podido formar la hermosa familia que hoy tenemos con nuestros dos hijos, Irina y Elías.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con aplicaciones reducidas de FSH diluida en una formulación de liberación lenta a base de ácido hialurónico (AH). En el experimento 1, se evaluó la vía de administración de la FSH diluida en AH en una sola aplicación. No hubo diferencias en el número de embriones transferibles entre las vacas del grupo Control (8 aplicaciones de FSH diluida en solución fisiológica cada 12 h y por 4 días; $10,3 \pm 3,4$) y las tratadas con FSH diluida en HA y administrada por vía intramuscular (i.m.; $5,0 \pm 1,7$); pero el número de embriones fue menor ($1,3 \pm 1,1$; $P < 0,05$) con la administración subcutánea. En el experimento 2, se compararon dos concentraciones distintas de AH (10 o 20 mg/mL) por vía i.m. en una sola aplicación. La FSH diluida en la solución más concentrada de AH resultó en un mayor número de embriones transferibles ($6,8 \pm 0,8$ y $2,9 \pm 0,7$ respectivamente, $P < 0,05$). En el experimento 3 se comparó un tratamiento de una sola aplicación i.m. de FSH diluida en una solución 20 mg/mL de AH con la de un protocolo superestimulador Control (8 aplicaciones de FSH cada 12 h por 4 días). No se encontraron diferencias ($P > 0,05$) entre los dos protocolos en el número de embriones transferibles obtenidos ($7,1 \pm 1,3$ y $5,3 \pm 0,8$; respectivamente). El experimento 4 tuvo como objetivo evaluar la respuesta superovulatoria de donantes Angus, Brangus y Bonsmara tratadas con distintas dosis de FSH diluida en AH (20 mg/mL) y administrada en una única inyección por vía i.m. o de FSH diluida en solución fisiológica y administrada en 8 inyecciones cada 12 h y por 4 días. Los resultados obtenidos sugieren que las dosis adecuadas para dichas razas son 300, 260 y 200 mg respectivamente. A pesar de que estos resultados demostraron que una sola aplicación de FSH diluida en 20 mg/mL de AH resulta en una satisfactoria respuesta superovulatoria, la solución de AH es demasiado viscosa y difícil de mezclar con la FSH. Para evitar esto se realizó el experimento 5 para evaluar concentraciones más bajas de AH (10 y 5 mg/mL) pero en dos aplicaciones cada 48 h. No hubo diferencias en el número de embriones transferibles en las vacas tratadas con el tratamiento Control ($6,7 \pm 1,3$) y las tratadas con dos aplicaciones cada 48 h de FSH en AH ($8,9 \pm 1,4$ y $9,3 \pm 1,9$ para 10 y 5 mg/mL, respectivamente). Por último, el experimento 6 tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la dilución de FSH en 5 mg/ml AH y administrado en dos aplicaciones i.m. cada 48 hs, luego de haber sido refrigerada o congelada por dos semanas. No se

encontraron diferencias entre los distintos métodos de conservación de la dilución ($P>0,05$). En conclusión la superestimulación con una o dos aplicaciones de FSH diluida en AH resulta en una producción de embriones transferibles similar a la de un tratamiento tradicional de dos inyecciones i.m. 2 veces al día durante 4 días.

Palabras claves: Superovulación, FSH, ácido hialurónico, intramuscular, dosis.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the superovulatory response in donors treated with reduced applications of FSH diluted in a slow release formulation based on hyaluronic acid (HA). Experiment 1, was designed to evaluate the route of administration (i.m. or s.c.) of FSH diluted in AH in a single injection. There were no differences in the number of transferable embryos between cows in the Control group (8 twice-daily administrations of FSH diluted in saline for 4 days; 10.3 ± 3.4) and those treated with FSH diluted in HA and administered intramuscularly (i.m.; 5.0 ± 1.7); however, the number of transferable embryos was lower in those that were treated subcutaneously (1.3 ± 1.1 ; $P < 0.05$). Experiment 2 was designed to compare two concentrations of HA (20 mg/mL or 10 mg/mL) in a single i.m. injection. The FSH diluted in the more concentrated HA solution resulted in more ($P < 0.05$) transferable embryos (2.9 ± 0.7 and 6.8 ± 0.8 , for 10 mg/mL and 20 mg/mL, respectively). Experiment 3 was designed to compare superovulatory response in donor cows treated with a single i.m. injection of Folltropin-V diluted in 20 mg/mL of HA with those treated with the Control protocol (8 twice-daily i.m. injections for 4 days). No difference ($P > 0.05$) in the number of transferable embryos was found between the two treatments (7.1 ± 1.3 and 5.3 ± 0.8 , respectively). Experiment 4 was designed to compare superovulatory responses in Angus, Brangus and Bonsmara donor cows following the use of different dosages of FSH diluted in HA given as a single i.m. administration or by multiple i.m. injections. Results suggest that the appropriate dosages for each breed are 300, 260 and 200 mg, respectively. Although these results demonstrated that a single administration of FSH diluted in 20 mg/mL HA results in a satisfactory superovulatory response, the AH solution was too viscous and difficult to mix with the FSH. Therefore, Experiment 5 was designed to evaluate superovulatory response in beef cows treated with two i.m. injections (48 h apart) of FSH diluted in reduced AH concentrations (10 mg/mL or 5 mg/mL). No differences ($P = 0.32$) were found in the number of transferable embryos in cows in the Control group (6.7 ± 1.3) and those treated with FSH diluted in an AH solution and given in two i.m. injections (8.9 ± 1.4 and 9.3 ± 1.9 for 10 mg/mL and 5 mg/mL, respectively). Finally, Experiment 6 was designed to investigate the efficacy of FSH-AH solution after storage in the freezer or in the refrigerator for two weeks. There were no significant differences among groups ($P > 0.05$). In conclusion, superstimulation by one or

two injections of FSH diluted in AH results in similar number of embryos than the traditional treatment in which FSH is administered in twice-daily i.m. injections for 4 days.

Keywords: Superovulation, FSH, hyaluronic acid, intramuscular, doses.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pag.
Capítulo 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
Ciclo estral bovino.....	1
Superovulación.....	8
Factores que afectan la respuesta superovulatoria	9
Gonadotrofinas y superovulación.....	14
Manipulación del desarrollo folicular y la ovulación.....	15
Tratamientos superovulatorios con dosis reducidas de gonadotrofinas.....	17
Polímeros de liberación lenta.....	18
Acido hialurónico.....	22
Uso clínico del Acido hialurónico.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
 Capítulo 2	 28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Ubicación del establecimiento y animales.....	28
EXPERIMENTO 1.....	28
EXPERIMENTO 2.....	29
EXPERIMENTO 3.....	29
EXPERIMENTO 4.....	30
Experimento 4.1.....	30
Experimento 4.2.....	30
Experimento 4.3.....	31
EXPERIMENTO 5.....	31
Experimento 5.1.....	31
Experimento 5.2.....	32
Experimento 5.3.....	32
EXPERIMENTO 6.....	33
ULTRASONOGRAFIA.....	33
COLECTA Y CLASIFICACION DE EMBRIONES.....	34
ANALISIS ESTADÍSTICO.....	34
 Capítulo 3	 36
RESULTADOS.....	36
EXPERIMENTO 1.....	36
EXPERIMENTO 2.....	38
EXPERIMENTO 3.....	44
EXPERIMENTO 4.....	48
Experimento 4.1.....	48
Experimento 4.2.....	52
Experimento 4.3.....	54
EXPERIMENTO 5.....	56
Experimento 5.1.....	56

Experimento 5.2.....	57
Experimento 5.3.....	57
EXPERIMENTO 6.....	58
Capítulo 4	60
DISCUSIÓN.....	60
Capítulo 5	75
CONCLUSIONES.....	75
Capítulo 6	76
BIBLIOGRAFÍA.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas de carne tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 10 mL de AH (20 mg/mL) y aplicada por vía i.m. o s.c. en la base de la oreja.....	36
Tabla 3.2. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL o 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.....	38
Tabla 3.3. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH con una sola aplicación de FSH diluida en 10 mg/mL o 20 mg/mL de AH.....	39
Tabla 3.4. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL o 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.....	41
Tabla 3.5. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL o 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.....	42
Tabla 3.6. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH con una sola aplicación de FSH diluida en 10 mg/mL o 20 mg/mL de AH.....	42
Tabla 3.7. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.....	45
Tabla 3.8. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH en vacas Angus tratadas con dosis decrecientes de FSH durante 4 días ó una sola aplicación de FSH diluida en 20 mg/mL de AH.....	45
Tabla 3.9. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.....	47

Tabla 3.10. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.....	48
Tabla 3.11. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.....	49
Tabla 3.12. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupo.....	49
Tabla 3.13. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupo.....	50
Tabla 3.14. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.....	53
Tabla 3.15. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupos.....	53
Tabla 3.16. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales...	54
Tabla 3.17. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.. Efectos de grupos.....	54
Tabla 3.18. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.....	55
Tabla 3.19. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupos.....	55

Tabla 3.20. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales...	56
Tabla 3.21. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupos...	56
Tabla 3.22. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas <i>Bos Taurus</i> tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.....	57
Tabla 3.23. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/L de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.....	57
Tabla 3.24. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas <i>Bos Taurus</i> tratadas con 400 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/mL de AH o 5 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.....	58
Tabla 3.25. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V diluida en 5 mg/ml de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h. La FSH fue reconstituida en el momento de su aplicación o fue reconstituida y congelada o refrigerada (3 a 5°C) por dos semanas antes de ser aplicada.....	59
Tabla 3.26. Número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro (\pm EE) en el inicio del tratamiento superovulatorio (Día 4), número de folículos \geq 9 mm de diámetro en el Día 8, número de CL y número de ovocitos/embriones en vacas Angus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V diluida en 5 mg/ml de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h. La FSH fue reconstituida en el momento de su aplicación o fue reconstituida y congelada o refrigerada (3 a 5°C) por dos semanas antes de ser aplicada.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	37
Figura 3.2. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	37
Figura 3.3. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	38
Figura 3.4. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovuladorio.....	39
Figura 3.5. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm durante y después del tratamiento superovuladorio.....	40
Figura 3.6. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	40
Figura 3.7. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	40
Figura 3.8. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovuladorio.....	43
Figura 3.9. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	43
Figura 3.10. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	44
Figura 3.11. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	44
Figura 3.12. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovuladorio.....	46
Figura 3.13. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	46
Figura 3.14. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	46
Figura 3.15. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	47
Figura 3.16. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovuladorio.....	51

Figura 3.17. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	51
Figura 3.18. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	52
Figura 3.19. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superestimuladorio.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.....	Acido desoxirribonucleico
AH.....	Acido hialurónico
AMH.....	Hormona anti-mülleriana
ANAVA.....	Análisis de la varianza
BSA.....	Albúmina sérica bovina
CL.....	Cuerpo lúteo
Cm ³	Centímetro cúbico
eCG.....	Gonadotropina coriónica equina
E.E.....	Error estándar
FIV.....	Fertilización in vitro
Fig.....	Figura
FSH.....	Hormona folículo estimulante
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotropinas
h.....	Hora
hMG.....	Gonadotropina menopausica humana
IETS.....	Sociedad internacional de transferencia de embriones
IRAC.....	Instituto de reproducción animal de Córdoba
i.m.....	Intramuscular
Ig.....	Inmunoglobulina
LH.....	Hormona luteinizante
LSD.....	Diferencia mínima significativa
mg.....	Miligramos

mHZ.....	Megahercio
mL.....	Militro
mm.....	Milímetros
ng.....	Nanogramos
P.....	Valor P, valor estadístico calculado
PBS.....	Tampón fosfato salino
PEG.....	Polietilen glicol
PGF.....	Prostaglandina
pI.....	Punto isoeléctrico
pLH.....	Hormona Luteinizante porcina
PMMA.....	Polimetilmetacrilato
PVC.....	Policloruro de vinilo
PVP.....	Polivinilpirrolidona
RFA.....	Recuento folículos antrales
s.c.....	Subcutánea
SNC.....	Sistema nervioso central
TGF- β	Factor de crecimiento transformante
UNC.....	Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
vs.....	Versus (Contra)
Al(OH) ₃	Hidróxido de aluminio
μ	Micrón
μ g.....	Microgramo
°C.....	Grados celcius

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las biotecnologías han progresado considerablemente, sobre todo en el área de la reproducción y la genética molecular. Entre las tecnologías reproductivas, la inseminación artificial, la superovulación y el trasplante embrionario han tenido un impacto notable en los programas de mejoramiento del ganado bovino (Bó y Mapletoft, 2003). Estas tecnologías aceleran el progreso genético, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades e incrementan el número de animales que pueden criarse a partir de un progenitor superior.

Para comprender como es la fisiología reproductiva de la vaca se realizará una descripción de su ciclo estral y sus principales características.

CICLO ESTRAL BOVINO

La vaca es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año), el ciclo estral se define como el período de tiempo entre la ocurrencia de un estro a otro estro. El ciclo estral está formado por ondas de desarrollo folicular y se han descrito ciclos estrales con 2, 3 y hasta 4 ondas de desarrollo folicular (Adams, 1998). Normalmente se dice que el ciclo estral tiene una duración de aproximadamente 21 días con un rango que va de 17 a 24 días (Ginther et al., 1989; Adams et al., 1994). De acuerdo a la cantidad de ondas que tenga una vaca va a ser la duración del ciclo estral.

El ciclo estral bovino está regulado por la interacción entre las hormonas secretadas principalmente en el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas (ovarios) y el útero, y constituyen lo que se conoce como eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal-uterino.

Eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal-uterino

Se ha demostrado que la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) induce la liberación de LH y FSH tanto in vivo como in vitro (Stevenson, 1994). La GnRH es un decapeptido producido en las porciones medio-basal y anterior del hipotálamo (particularmente en el núcleo arcuato) y es secretada en los vasos portales hipofisarios para alcanzar las células secretoras de gonadotropinas de la adenohipófisis.

Las interrelaciones del hipotálamo, pituitaria anterior, ovario y útero son complejas. La actividad neural del sistema nervioso central (SNC; hipotálamo) provoca pulsos de liberación de GnRH de neuronas neurosecretoras especializadas. Cada pulso de GnRH libera un pulso de hormona luteinizante y de hormona folículo estimulante (LH y FSH respectivamente) y a su vez cada pulso de LH produce un pulso de secreción de estradiol folicular. Estos pequeños pulsos de estradiol inducen una retroalimentación negativa al hipotálamo, especialmente ante la presencia de progesterona durante la fase luteal, inhibiendo la liberación de GnRH y por lo tanto, la liberación de LH/FSH y regulando la secreción de estradiol.

Este mecanismo de retroalimentación negativa cambia substancialmente cuando las concentraciones de progesterona disminuyen durante la luteólisis. En este momento, la retroalimentación negativa de progesterona sobre la GnRH cesa y se elevan las concentraciones de LH en plasma como resultado del aumento de la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH. El aumento en la frecuencia de los pulsos de LH estimula la producción de estradiol por parte del folículo dominante preovulatorio en desarrollo, el cual alcanza un pico con niveles suficientes para accionar las descargas preovulatorias de LH y FSH a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis (Butler et al., 1983; Schallenberger et al., 1984; Ireland, 1987; Adams et al., 1992).

En resumen, las hormonas sintetizadas por los componentes del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal-uterino ejercen un control a través de un delicado sistema de

regulación mediante el cual una hormona puede inhibir la liberación de otra hormona (retroalimentación negativa), o por el contrario estimular la síntesis y liberación de una mayor cantidad de hormona, llamado retroalimentación positiva (Butler et al., 1983; Schallenberger et al., 1984; Ireland, 1987; Adams et al., 1992).

Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso por el cual un folículo primordial 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 (Senger, 1997; Rajesh, 2007). Este fenómeno de crecimiento y diferenciación folicular es continuo pero a su vez es irreversible. Los folículos pueden ser clasificados en primarios, secundarios, terciarios o antrales y de Graff o preovulatorios, de acuerdo al número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, diámetro del ovocito, presencia o ausencia del antro (Lundy et al., 1999; Rajesh, 2007).

Muy pocos folículos llegan a la ovulación, debido a que cuando un folículo entra en el grupo de crecimiento la gran mayoría se degenera por atresia (99% o más de los folículos). El tiempo necesario para que un folículo primario llegue a ser un folículo preovulatorio en la vaca es de 60 días (Lussier et al., 1987). Los folículos antrales crecen en ondas (Ginther et al., 1989) debido al estímulo de la FSH (Adams et al., 1992, 1994; Evans, 2003). El número de folículos ≥ 3 mm de diámetro reclutado en cada onda se puede contar (cantidad de folículos antrales, CFA) en diferentes días del ciclo estral en vacas y vaquillonas para carne y leche (Singh et al., 2004; Evans et al., 2010; Ireland et al., 2011). La cantidad de folículos antrales es altamente variable entre animales pero es muy repetible (0,85 a 0,95) en un mismo animal (Mossa et al., 2010). Ireland et al., 2008 demostraron que animales con baja cantidad de folículos antrales tienen ovarios más pequeños comparados con vacas de la misma edad y con alta cantidad de folículos antrales. Además, vacas con baja cantidad de folículos antrales tienen menor respuesta superovulatoria (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007) y reducidas concentraciones de progesterona circulante por ciclo

estral (Jimenez-Krassel et al., 2009) comparados con vacas de la misma edad y con alta cantidad de folículos antrales.

Un folículo pasa de ser primordial a primario cuando la capa de células de la granulosa se transforma de planas a cuboides y la teca interna comienza su diferenciación. Su crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario, se completa por la proliferación de las células de la granulosa (van den Hurk y Zhao, 2005; Rajesh, 2007). Un folículo con más de 6 capas de células y la formación de un antro lleno de líquido, se denomina terciario, también conocido como folículo antral (Lussier et al., 1987; Rajesh, 2007). 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). Por otro lado, los folículos de Graff o preovulatorios pueden llegar a ≥ 15 mm de diámetro y se convierten en el folículo ovulatorio (van den Hurk y Zhao, 2005).

Fases del ciclo estral

El ciclo estral se puede dividir en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro (Rathbone et al., 2001). Proestro es el período que precede al estro y se caracteriza por la regresión del cuerpo lúteo (CL) del ciclo estral anterior (duración media, 2 días; Rathbone et al., 2001). El estro es el período en que la hembra es receptiva al apareamiento, tiene una duración de entre 6 y 18 horas. La ovulación tiene lugar aproximadamente 28 horas después del inicio del estro, y es seguido por desarrollo de un CL en el lugar donde se produjo la ovulación (Rathbone et al., 2001). Metaestro se inicia inmediatamente después de la interrupción del celo y se caracteriza por el desarrollo temprano del CL (media, 3 días; Adams et al., 2008). Diestro es el período en que el CL está completamente desarrollado y activo (Adams et al., 2008), que puede durar hasta 15-17 días en ausencia de preñez, o el CL se puede mantener hasta el parto si la hembra queda preñada (Adams et al., 2008). Las concentraciones plasmáticas de progesterona aumentan entre el día 4 al día 12 del ciclo para permanecer constantes hasta el momento de la luteólisis. A través de la utilización de la ultrasonografía aplicada a la reproducción, se puede detectar el momento

de la ovulación (Pierson y Ginther, 1988). A partir de esto, el concepto del ciclo estral se puede definir como el período de tiempo entre dos ovulaciones o intervalo inter-ovulatorio.

Hay 2 fases básicas del ciclo estral que se basan en las estructuras del ovario: folicular y luteal.

Fase folicular

La fase folicular comienza con la luteólisis, en la cual las concentraciones de progesterona en sangre decaen abruptamente a niveles menores a 1 ng/ml. La caída de las concentraciones de progesterona elimina la retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas, por lo que aumenta la frecuencia de los pulsos de LH y, en menor grado, la de FSH (Schams, 1987).

El aumento de la pulsatilidad de LH estimula el desarrollo del folículo dominante, que secreta cantidades crecientes de estradiol. El grado de desarrollo folicular al momento de la luteólisis determina el tiempo que transcurre hasta que un folículo completa su crecimiento y es capaz de producir cantidades suficientes de estradiol como para iniciar el celo y la descarga preovulatoria de LH (Ireland, 1987).

Fase luteal

Como se mencionó anteriormente, luego de la ovulación comienza a formarse el CL gracias a la invasión por parte de células que proliferan de la capa de la granulosa y de la teca (Rathbone et al., 2001). Las células de la teca se convierten en células de menor diámetro, conocidas como células luteales pequeñas. Las células de la granulosa se convierten en células luteales de mayor tamaño también llamadas células luteales grandes. Las células luteales pequeñas contribuyen con aproximadamente el 15% de la progesterona secretada por el CL, mientras que el resto es derivado de las células luteales grandes. Sin embargo, las células grandes poseen casi todos los receptores para PGE₂ y PGF_{2α} (Braden et al., 1988).

A su vez, las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse en los días 3 ó 4, alcanzando un pico entre los días 8 y 12, y luego disminuyen hasta concentraciones basales antes del próximo estro, como respuesta a la secreción uterina de PGF_{2α} y en ausencia de un embrión viable en el útero (Adams et al., 2008).

Endocrinología y dinámica folicular

El desarrollo de técnicas para la medición de concentraciones hormonales y la ultrasonografía, permitieron un mayor entendimiento del control fisiológico del crecimiento folicular. Hace varios años atrás, Rajakoski (1960) reportó que durante el ciclo estral bovino ocurrían dos ondas de crecimiento folicular. Según un estudio que él realizó evaluando cortes histológicos de 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, una entre los días 3 y 4, y otra entre los días 12 y 14 (Savio et al., 1988). Diferentes autores quisieron corroborar los datos publicados por Rajakoski, pero al no obtener los mismos resultados, refutaron la teoría de las ondas y apoyaron la noción de que el crecimiento folicular era continuo e independiente de las fases del ciclo estral (Choudary et al., 1968; Donaldson y Hansel, 1968; Marion et al., 1968). Donaldson y Hansel (1968) informaron que el crecimiento y la atresia de los folículos eran un proceso continuo. Luego, Matton et al. (1981) indicó que el crecimiento y el recambio de los folículos grandes era más rápido al final que al comienzo del ciclo estral. No obstante, 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, 1983) y en aumento de los niveles sanguíneos de estradiol (Ireland y Roche, 1987).

Posteriormente, gracias a la utilización de la ultrasonografía transrectal en tiempo real (Pierson y Ginther 1984) en estudios de poblaciones foliculares (Pierson y Ginther 1988) o por el seguimiento de folículos individuales (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988; Knopf et al., 1989) se pudo documentar convincentemente que el desarrollo folicular tiene un patrón de crecimiento en ondas (Savio et al., 1990; Martinez et al., 2003). Este patrón de crecimiento folicular se mantiene en los distintos estados de la hembra bovina,

como en el período pre púber, gestación y posparto (Savio et al., 1990; Adams et al., 1994; Evans et al., 1994; Ginther et al., 1996).

Los ciclos estrales en su gran mayoría (>95%) son de 2 o 3 ondas foliculares (Adams, 1998). Una onda de crecimiento folicular ovárico en la hembra bovina implica el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos, en donde un folículo se convertirá en dominante y el resto en subordinados (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988; Knopf et al., 1989). En otras palabras, todos los folículos crecen durante 2 o 3 días aproximadamente y uno de ellos es seleccionado, continúa creciendo y se convierte en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos, llamados subordinados, se atresian (Ginther et al., 1989). En vacas con 2 ondas, la aparición de la primera onda ocurre en el Día 0 (día de la ovulación) y la segunda onda emerge en el Día 10, mientras que en vacas de 3 ondas las emergencias de las ondas son en los días 0, 9 y 16 (Ginther et al., 1989).

La hormona folículo-estimulante (FSH) juega un papel importante en el control del crecimiento folicular en el ganado bovino ya que se ha demostrado que hay incrementos de la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda (Adams et al., 1992). Esta descarga de FSH es aparentemente responsable del reclutamiento de los folículos de una onda folicular y comienza dos días antes de la emergencia de una onda folicular, para llegar al pico máximo un día antes o el día de comienzo de la onda. De manera que se observan 2 picos de FSH en los ciclos de 2 ondas y 3 picos de FSH en los ciclos de 3 ondas (Adams et al., 1992). Los niveles de FSH más bajos se encuentran alrededor del Día 3 (desviación folicular), es decir, cuando el folículo dominante alcanzó los 8,5 mm y el subordinado mide 7,2 mm aproximadamente (Ginther et al., 1996). El folículo dominante produce grandes cantidades de inhibina y estradiol-17 β , ambas hormonas actúan sistémicamente para suprimir los niveles circulantes de FSH (Martin et al., 1991; Findlay et al., 1992; Sunderland et al., 1996). A raíz de esto, los folículos subordinados se atresian debido a que los niveles de FSH circulantes están por debajo de los niveles necesarios para poder crecer, mientras que el folículo dominante posee los medios necesarios para seguir creciendo con bajos niveles de FSH (Ginther et al., 2000).

Según Ginther et al. (1996) el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH debido a que éste posee receptores de LH en las células de la granulosa. Todos los folículos tienen receptores de LH en las células de la teca y receptores de FSH en las células de la granulosa (Ireland, 1987) pero solo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa. La LH al unirse a los receptores ubicados en las células de la granulosa estimula la producción de estradiol permitiendo al folículo seguir creciendo a pesar de que los niveles de FSH circulante disminuyen, es por eso, que el folículo dominante es LH dependiente (Ginther et al., 2001).

En vacas de 2 ondas, el folículo dominante de la primera onda será anovulatorio, ya que dicho folículo se desarrolla bajo altos niveles de progesterona. Estos elevados niveles de progesterona no suprimen la liberación de FSH (Adams et al., 1992) pero como se mencionó recientemente afecta adversamente la frecuencia de los pulsos de LH (Stock y Fortune, 1993). Consecuentemente, al verse afectada la liberación de LH, el folículo dominante comienza a regresar, lo que a su vez, cesa la secreción de estradiol e inhibina generando un aumento en las concentraciones de FSH circulante, dando origen a una nueva onda de desarrollo folicular. Hacia el final del ciclo estral, los niveles circulantes de progesterona disminuyen al ocurrir la luteólisis, lo que permite el incremento en los pulsos de LH. Esto va a generar un mayor crecimiento del folículo dominante, estimulando mayor producción de estradiol circulante, induciendo los signos característicos de celo (inmovilización a la monta) y el pico preovulatorio de LH.

SUPEROVULACIÓN

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación es producir un alto número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez (Bó et al., 2002). Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos es variable, lo cual se transforma en una falta de previsibilidad y constituye uno de los factores limitantes de la técnica (Looney, 1986; Hahn, 1992).

Historia

En los últimos años, se ha incrementado considerablemente la transferencia de embriones bovinos tanto con animales de cría como en rodeos de leche. La mayor parte de la tecnología de transferencia embrionaria se desarrolló en los años 1970 y 1980, sin embargo, la historia del concepto se remonta mucho tiempo atrás.

La transferencia de embriones la realizó por primera vez Walter Heape en 1890 en Cambridge, Inglaterra, cuando realizó una transferencia de embriones en conejos. Luego, en la década del 30 se comenzaron a realizar trabajos de transferencia de embriones en animales productores de alimentos, en donde se utilizaron ovejas y cabras. 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.

A partir de la década de los 90, a raíz de la combinación de la disponibilidad de medicamentos en el mercado y nuevos conocimientos (por ejemplo, la ultrasonografía) la transferencia de embriones continuó difundiendo y adoptándose tanto por profesionales como por productores (Bó y Mapletoft, 2009).

FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

Como se mencionó anteriormente, la técnica de superovulación y transferencia de embriones se ha utilizado en todas partes del mundo, su principal limitación es la gran variabilidad de la respuesta superovulatoria (Thibier, 2003). Si bien los factores que afectan la respuesta superovulatoria son diversos, la variación individual es un factor determinante en esta técnica. Looney (1986) y Hahn (1992) han reportado datos de una gran cantidad de superovulaciones y se puede ver cómo un pequeño porcentaje de donantes de embriones produce la mayoría de los embriones viables.

Los factores que afectan la respuesta superovulatoria se pueden clasificar en factores intrínsecos y en factores extrínsecos (Mapletoft et al., 2000). Dentro de la primera

clasificación se encuentran: estatus nutricional, historia reproductiva, edad, raza y estatus ovárico de la donante. Mientras que, la pureza y dosis de la hormona utilizada, vía y lugar de aplicación, frecuencia y época del año, corresponden a factores extrínsecos. Dentro de esta tesis se va a hacer mayor incapié en los factores extrínsecos como son: vía de aplicación, frecuencia y dosis de hormona superestimuladora, como así también las diferentes razas.

A continuación se hará una breve descripción de algunos factores que afectan la respuesta superovulatoria.

Estatus nutricional

La nutrición inadecuada afecta la función reproductiva en la mayoría de los mamíferos. Murphy et al. (1991) demostraron que el consumo de una dieta baja en energía reduce el diámetro del folículo dominante y acorta su persistencia en el ovario.

Años más tarde, 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 detectaron un efecto negativo (Sartori et al., 2007). 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 sobre todo la calidad de los embriones (Sartori et al., 2007).

Edad

Según Hasler (1992), la edad no es un factor determinante en la respuesta a la superovulación. En general, sólo encontró pequeñas diferencias en las respuestas de las vacas de entre dos y catorce años. Donaldson (1984) también observó que no hubo efecto de la edad sobre el número total de embriones recuperados hasta los nueve años de edad.

Luego de los nueve años de edad se produjo una disminución en la respuesta medida en la cantidad de embriones transferibles. La disminución de la respuesta superovulatoria tal vez fue debida a una reducción en el número de folículos (Lerner et al., 1986). Sin embargo, Malhi et al. (2005) encontró que las células de los ovocitos y la cantidad de embriones transferibles es menor en vacas viejas que en vacas jóvenes.

Raza

Se sabe que existen diferencias en la fisiología reproductiva de bovinos de las razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Se ha reportado que las razas *Bos indicus* tienen un mayor número de folículos por cada onda folicular (Carvalho et al, 2008) y a su vez se ha obtenido un mayor número de ovocitos después de una aspiración folicular (3 a 4 veces mayor; Martins et al., 2007). Además, se ha demostrado que las razas *Bos indicus* tienen una mayor sensibilidad a las gonadotropinas exógenas que las razas *Bos taurus* (Baruselli et al., 2006).

A su vez, dentro de razas *Bos taurus* algunas requieren mayor cantidad de FSH que otras. Por ejemplo, Chupin et al. (1985) sugirieron que las vacas Holstein requieren una dosis mayor de FSH que vacas de la raza Charolais.

Estatus ovárico de la donante

Como mencionamos anteriormente una de las principales problemáticas que tiene la transferencia de embriones es la alta variabilidad en la respuesta superovulatoria. Sin embargo, la respuesta de una vaca es bastante repetible luego de los distintos tratamientos superovulatorios. Moor et al. (1984) demostraron que tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada donante. Los animales que tienen una baja respuesta a un tratamiento superovulatorio, probablemente continuarán de la misma forma en los siguientes tratamientos y los animales que responden bien continuarán haciéndolo en esa forma. Es importante tratar de identificar a los animales con una buena respuesta superovulatoria para que la técnica sea más eficiente, como por ejemplo medir las concentraciones plasmáticas de la hormona

antimuleriana (AMH), que está correlacionada con el número de folículos que tienen las vacas en el ovario (Monniaux et al., 2013)

Singh et al. (2004) postuló que la respuesta superovulatoria está relacionada de manera intrínseca con el número de folículos reclutados en la onda folicular. Por lo tanto, vacas con mayor cantidad de folículos por onda producen mayor cantidad de embriones. Recientemente se han llevado a cabo diferentes estudios con el fin de determinar las causas de la variabilidad en cuanto a la cantidad de folículos (ovocitos), encontrándose gran variabilidad entre individuos pero una alta repetitividad por individuo (Burns et al. 2005; Ireland et al., 2007; Ireland et al., 2008; Jiménez-Krassel et al., 2009; Mossa et al. 2010). Estos estudios se basan en el recuento de folículos antrales (RFA folículos ≥ 3 mm de diámetro), los animales con bajos RFA tienen mayores concentraciones séricas de FSH y LH, pero menores concentraciones de hormona anti-mulleriana, progesterona y andrógenos que los animales con un alto RFA (Burns et al. 2005, Ireland et al. 2007, Mossa et al. 2010). En este mismo trabajo se evaluó el efecto del ambiente materno durante la gestación sobre el RFA de sus crías al restringir la nutrición materna durante el primer tercio de gestación, encontrándose que los terneros nacidos de las madres restringidas nutricionalmente tenían un 60% menos de RFA en comparación con los terneros nacidos de madres sin restricción (Mossa et al., 2010).

Época del año

Los estudios realizados teniendo en cuenta el efecto de la época del año sobre la respuesta a la superovulación, han arrojado resultados contradictorios. Mientras que algunos investigadores (Church y Shea, 1977; Hasler et al, 1983) han informado de una influencia de la temporada en la respuesta a la superovulación, otros (Critser et al., 1980; Massey y Oden, 1984; Shea et al., 1984) no encontraron un efecto consistente de la época del año en la respuesta superovulatoria.

En un trabajo más reciente, donde se analizaron datos de manera retrospectiva para comparar la influencia de la estación sobre la producción de embriones en el centro IRAC-

BIOGEN en Córdoba, Argentina, se encontró que las estaciones de invierno y primavera fueron las más favorables para producir un mayor número de embriones transferibles (Ochoa et al., 2009). Además, durante los meses de verano, se produce un estrés térmico en las vacas Holstein afectando la calidad de los embriones (Sartori et al., 2002).

Pureza de la hormona utilizada

Se ha reportado que cuando se utilizan extractos de pituitaria purificados, con baja contaminación de LH, mejora la respuesta superovulatoria en el ganado bovino (Mapletoft et al., 2002). Sin embargo, se piensa que cierta cantidad de LH es necesaria para lograr una buena respuesta superovulatoria. 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).

Dosis de la hormona utilizada

A la hora de elegir una dosis de gonadotrofina, es importante tener en cuenta la raza, la edad y la historia reproductiva de la donante. Como mencionamos anteriormente, las razas *Bos indicus* son más sensibles a las dosis de gonadotrofinas para realizar una superestimulación, por lo tanto las dosis utilizadas en estas razas son más bajas que para razas *Bos taurus* (Baruselli et al., 2006).

Trabajos realizados hace ya algunos años, indicaron que la dosis recomendada para superovular vacas *Bos taurus* era de 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (Gonzalez et al., 1990; Bó et al., 1994). En la actualidad esa dosificación es recomendada para vacas Holstein en lactancia, pero 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 200 a 260 mg en vaquillonas (Bó y Mapletoft, 2014).

GONADOTROFINAS Y SUPEROVULACIÓN

Tres diferentes tipos de gonadotrofinas han sido utilizadas para inducir una respuesta superovulatoria en vacas donantes: extractos de pituitaria semi purificados o purificados de FSH, gonadotropina coriónica equina (eCG) purificada del plasma de yeguas preñadas y la gonadotropina menopáusica humana (hMG; Alkemade et al., 1993; Mapletoft et al., 2002).

Los tratamientos superovulatorios utilizados tradicionalmente constan de una aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) por vía intramuscular o aplicaciones cada 12 horas durante 4 días de un extracto pituitario con FSH (Mapletoft et al., 1991). Por otro lado, la hMG no se la utiliza en veterinaria por su alto costo sino que es utilizada principalmente en humanos. La hMG tiene la misma cantidad de FSH que de LH y los tratamientos consisten en aplicaciones cada 12 h en dosis decrecientes por 4 o 5 días (McGowan et al., 1985).

La eCG, es una glicoproteína que tiene una prolongada vida media (más de 40 h), lo que representa una ventaja desde el punto de vista práctico dado que una sola aplicación es suficiente para provocar una apropiada estimulación ovárica (Schams et al., 1977; Wang et al., 1988; Murphy y Martinuk, 1991). Sin embargo, una prolongada estimulación con eCG provoca un incremento en la cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colecta de embriones (González et al., 1994a; 1994b). Contrariamente, la vida media de la FSH en la vaca es de 5 h (Laster, 1972; Demoustier et al., 1988) resultando en aplicaciones más frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria (Bellows et al., 1969; Monniaux et al., 1983). El tratamiento consiste en 8 dosis decrecientes por vía intramuscular durante 4 días con un intervalo de 12 horas entre cada aplicación. Tratamientos con dos aplicaciones diarias de FSH han resultado en una mayor respuesta superovulatoria que tratamientos con una sola aplicación diaria (Looney et al., 1981; Walsh et al., 1993; Kelly et al., 1995).

MANIPULACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR Y LA OVULACIÓN

Tradicionalmente, los programas de superovulación en el ganado bovino son comenzados durante la fase luteal media, preferentemente entre los días 8 a 12 después de observado el celo, ya que se obtienen mejores respuestas superovulatorias que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (días 12 a 13; Lindsell et al., 1986; Mapletoft y Pierson, 1993; Mapletoft et al., 2000). Esto se debe a que en el ciclo estral bovino hay 2 o 3 (a veces 4 en el cebú) ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza, en promedio, entre los días 9 y 10 (Ginther et al., 1989; Bó et al., 2003).

También, se ha demostrado que los tratamientos superovulatorios deben iniciarse al comienzo de una onda de desarrollo folicular para obtener la mejor respuesta posible (Adams et al., 1994; Bó et al., 1995; Bungarts y Niemann, 1994; Nasser et al., 1993;). La necesidad de tener que esperar a que las vacas lleguen a la mitad del ciclo estral para comenzar con el tratamiento requiere un monitoreo del celo (con todos los riesgos que esto implica), además, al depender del momento del estro de cada donante no se puede organizar grupos de donantes para optimizar nuestro trabajo. Una alternativa para evitar estos problemas es la sincronización de la emergencia de la onda folicular. Básicamente existen tres métodos para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superovulación que se describen a continuación.

Ablación folicular

Es un método mecánico, en donde se realiza la aspiración de todos los folículos mediante ultrasonografía transvaginal, lo que resulta en el comienzo sincrónico de una nueva onda folicular 1,5 días más tarde (Bergfelt et al., 1994). La ablación folicular es un método eficaz para sincronizar la onda folicular y se comienza el tratamiento superovulatorio 1,5 a 2 días después (Bergfelt et al., 1997), pero tiene como desventaja que se requiere de un equipo sofisticado (ecógrafo con transductor micro convexo, bomba de vacío, etc.) y además de una persona con los conocimientos necesarios para llevar adelante la técnica.

GnRH ó pLH

Otro método para la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular es el uso de GnRH ó LH para inducir la ovulación del folículo dominante seguido por la emergencia de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (Macmillan y Thatcher, 1991; Pursley et al., 1995; Martinez et al., 1999). Sin embargo, la administración de GnRH ó LH no siempre induce la ovulación y si la ovulación no sucede la emergencia de una nueva onda folicular no se sincroniza (Martinez et al., 1999). En un estudio en donde incluyeron tres experimentos diferentes (Deyo et al., 2001), los resultados fueron consistentes en donde los tratamientos con GnRH ó LH tuvieron menor número de embriones que cuando la onda fue sincronizada con el método de la ablación folicular o el de estradiol y progesterona.

Progesterona y estradiol

El protocolo más utilizado en los últimos años consiste en la aplicación de dispositivos con progesterona o progestágenos junto con el uso de estradiol (Bó et al., 2006; Baruselli et al., 2006). Este tratamiento induce la atresia de todos los folículos y se inicia una nueva onda folicular aproximadamente 4,3 días después, por lo tanto, en el Día 4 se comienza con la administración de gonadotropina (Bó et al., 1994; 1995; 1996).

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, ya que permite el inicio del tratamiento superovulatorio en un grupo de donantes y en el momento que nosotros lo proponemos (Bó et al., 2002; 2006; Mapletoft et al., 2002). Además, la sincronización de la ovulación ha permitido la inseminación artificial de la donante a tiempo fijo, evitando así la necesidad de la detección de celo durante el protocolo de superestimulación (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006).

TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS CON APLICACIONES REDUCIDAS DE GONADOTROFINAS

La utilización de una o dos aplicaciones de FSH sería una alternativa útil a los tratamientos superovulatorios tradicionales. La necesidad de inyectar dos veces por día hace que el tratamiento requiera máxima atención y resulta a veces muy engorroso de aplicar en algunos establecimientos, dificultando la posibilidad de que esta técnica sea utilizada masivamente. Además, cuando el tratamiento es aplicado incorrectamente, las vacas no responden o si se las trata bruscamente puede causar estrés en algunas donantes, con la consiguiente disminución de la respuesta superovulatoria (Bó et al., 1991). El estrés agudo repetido puede alterar el pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982). Se ha reportado que el estrés por transporte disminuye el número de CL y aumenta los niveles de cortisol en vaquillonas superovuladas (Edwards et al., 1987). En trabajos más recientes, se demostró que el estrés ocasionado por el manejo reduce la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH para estimular la liberación de LH necesarias para el desarrollo del folículo y la ovulación en diferentes especies (Ciechanowska et al., 2010; Maeda et al., 2010; Kinsey-Jones et al., 2009). Además, el uso de inyecciones de ACTH exógena, disminuyó significativamente la pulsatilidad de LH (Ribadu et al., 2000). Estos informes sugieren que en el ganado bovino, el estrés por la excesiva cantidad de veces que deben pasar las vacas por la manga para recibir los tratamientos hormonales puede influir en la eficiencia de los tratamientos superovulatorios. El desarrollo de un tratamiento superovulatorio con una o dos aplicaciones de FSH, no sólo ahorra tiempo y mano de obra, sino también podría disminuir el estrés en las donantes de embriones.

En un estudio se administró 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (Bioniche Animal Health Inc., Belleville, ON, Canadá) en una sola aplicación subcutánea en vacas de carne que tenían una buena condición corporal (>3 en la escala del 1 al 5). El tratamiento resultó en una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional de dos aplicaciones al día durante 4 días (Bó et al., 1994). Sin embargo, los resultados no fueron repetibles en vacas Holstein que tenían menos tejido adiposo subcutáneo (Hockley et al., 1992).

En otro estudio realizado en vacas Holstein, la inyección única se dividió en dos (llamado tratamiento “Split”), con un 75% de la dosis de Folltropin-V administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el restante 25% administrada 48 horas después cuando normalmente se administra la PGF_{2α}. Los resultados fueron intermedios entre el tratamiento convencional de dos aplicaciones diarias y el protocolo de una sola aplicación subcutánea (Lovie et al., 1994). En un estudio realizado por Brogliatti et al. (1996) se confirmaron los resultados del experimento anterior.

Hasta aquí hemos visto que todos los trabajos relacionados con reducir el número de aplicaciones de FSH, han elegido la vía subcutánea (s.c.) para su aplicación. Por lo general, éstas se realizan en la tabla del cuello o detrás de la escápula. Recientemente se ha demostrado que la aplicación s.c. en la base de la oreja permite el tratamiento con antibióticos tanto en vacas como así también en otras especies como ovina, caprina y porcina (Washburn et al., 2005; Van Donkersgoed et al., 2008). De esta manera los niveles plasmáticos del antibiótico se mantienen por siete días, evitando la aplicación diaria del mismo. Esta nueva ruta de administración, permite además la aplicación de grandes volúmenes (1-15 mililitros). Permitiendo reducir la cantidad de inyecciones en el tratamiento superovulatorio.

POLÍMEROS DE LIBERACIÓN LENTA

Una opción alternativa para inducir una respuesta superovulatoria con una o dos inyecciones de FSH, sería combinarla con agentes que resultan en una liberación lenta y sostenible de la hormona durante varios días. Estos agentes son denominados comúnmente polímeros. Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros (grupos funcionales) que forman enormes cadenas de las formas más diversas.

Antecedentes

La utilización de los polímeros en medicina se inició a principios de los años 40 casi tan pronto como se comenzaron a sintetizar hilos de sutura (nylon) de la práctica clínica en

donde se realizaban estudios quirúrgicos experimentales. A mediados de la misma década, comenzaron a aparecer, artículos de revisión sobre el uso en cirugía de polímeros tales como nylon, PMMA, poliésteres de dacrón y PVC (Griffith, 2000).

En los últimos años, los polímeros han sido utilizados cada vez más como soporte y como herramienta para la liberación controlada de medicamentos o sustancias activas que se encuentran en una determinada formulación (Jinhua, 2007). El objetivo principal de la combinación de un fármaco con un polímero es la liberación controlada y con ello, conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva utilizando una única aplicación, y para eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos. En un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios (Baker, 1987; Fassihi y Ritschel, 1993). La velocidad de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que la rodea viene determinada por las propiedades del propio polímero y, en menor medida, depende de los factores ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura y los fluidos del organismo (Gehrke y Cussler 1989; Bae et al., 1991). Por ello, los sistemas de liberación controlada deben ser capaces de permitir la administración de sustancias bioactivas de una forma lenta y continua durante períodos dilatados de tiempo (Kou et al. 1988).

Las principales ventajas de los sistemas poliméricos de liberación controlada, considerados desde el punto de vista farmacológico son: a) los niveles de fármaco en plasma se mantienen de forma continua en el intervalo terapéutico deseado, pudiendo también ampliarse este período en el cual la terapia es efectiva para disminuir así el número de aplicaciones, b) los efectos no deseables, derivados de un metabolismo rápido o de una dosis excesiva, pueden reducirse e incluso eliminarse mediante una administración local a partir de un sistema polímero/fármaco, c) los fármacos que presentan "in vivo" unos tiempos pequeños de vida media pueden protegerse a la degradación (Graham, 1990; Langer et al., 1990). También pueden protegerse los tejidos corporales sensibles a

determinados medicamentos, haciendo a la administración del fármaco menos invasiva, y d) el aprovechamiento del fármaco es más eficaz y, por tanto, con un costo inferior. Se puede también disminuir la dosis necesaria cuando se trata de un agente activo de alto precio.

Sin embargo, estas ventajas deben evaluarse junto con las posibles desventajas que se pueden presentar en cualquier aplicación clínica específica (Lyman y Rowland, 1985; Dumitriu y Dumitriu-Medvichi, 1994): a) toxicidad o falta de biocompatibilidad del material polimérico usado, b) formación de productos secundarios nocivos procedentes del polímero, si éste no es biodegradable, c) la necesidad que existe en algunos casos de intervención quirúrgica para implantar el polímero en una localización apropiada, d) problemas derivados de la presencia del implante y e) alto costo de una determinada formulación polímero/fármaco, debido al precio del polímero o de su procedimiento de obtención.

Diversos polímeros han sido utilizados en el campo de la medicina veterinaria y más específicamente en el área de reproducción animal, con el objetivo de producir una liberación lenta de la hormona FSH. Uno de los polímeros utilizados es la polivinilpirrolidona (PVP; Yamamoto et al., 1994; Satoh et al., 1996; Callejas et al., 2002). La PVP, también llamado comúnmente polividona o povidona, es un polímero soluble en agua que se obtiene a partir del monómero vinilpirrolidona, por polimerización vinílica de radicales libres. La PVP fue inicialmente utilizada como un expansor del plasma sanguíneo y más tarde en una amplia variedad de aplicaciones en medicina, farmacia, cosmética y producción industrial. La PVP constituye un polímero ramificado. Su densidad es 1,2 g/cm³ y su punto de fusión es 150-180°C. El monómero vinilpirrolidona es carcinógeno y es extremadamente tóxico para la vida acuática; pero su polímero (la PVP) en estado puro es completamente inocuo. No sólo es inocuo, sino que, se lo emplea como expansor del plasma sanguíneo en víctimas traumatológicas desde mediados del siglo XX.

Otro polímero utilizado con el mismo fin es el Polietilenglicol (PEG; Choi et al., 2002). Los PEG son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, en función de sus pesos

moleculares. Los PEG se preparan por polimerización de óxido de etileno y están disponibles comercialmente en un amplio intervalo de pesos moleculares de 300 g/mol a 10.000.000 g/mol. Mientras que los PEG con diferentes pesos moleculares encuentran uso en diferentes aplicaciones y tienen diferentes propiedades físicas (por ejemplo, viscosidad) debido a los efectos de longitud de cadena, sus propiedades químicas son casi idénticas. El PEG es soluble en agua, metanol, benceno y diclorometano, y es insoluble en éter dietílico y hexano. Se acopla a moléculas hidrófobas para producir tensoactivos no iónicos. El PEG contienen posibles impurezas tóxicas, tales como óxido de etileno y 1,4- dioxano. El glicol de polietileno se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción es catalizada por catalizadores ácidos o básicos. El etilenglicol y sus oligómeros son preferibles como material de partida en lugar de agua, debido a que permiten la creación de polímeros con una baja polidispersidad (distribución de peso molecular estrecha). Se utilizan comercialmente en numerosas aplicaciones, tales como agentes tensoactivos, en los alimentos, en cosmética, en farmacia, en la biomedicina, como agentes dispersantes, como disolventes, en ungüentos, en bases de supositorios, como excipientes en tabletas y como laxantes.

El hidróxido de aluminio, a diferencia de los anteriores ejemplos no es un polímero, sino que es utilizado como adyuvante en vacunas ya que puede absorber macromoléculas (como por ejemplo, proteínas). Glenny et al., en 1926 fue uno de los primeros trabajos reportados en donde se utilizó el aluminio como adyuvante en vacunas. El aluminio en forma de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), fosfato de aluminio o alumbre, sigue siendo utilizado comúnmente como un adyuvante en las vacunas (Gupta et al., 1995). Si bien el hidróxido de aluminio es el único adyuvante permitido para la elaboración de vacunas en los Estados Unidos, existe una regulación en la cantidad de aluminio por dosis (Capítulo 21 del Código de Regulaciones Federales de EE.UU.). El reglamento fue modificado en 1981 para aumentar la cantidad de aluminio permitido de 0.85 mg/dosis a 1,25 mg en productos biológicos para dictar los reglamentos en consonancia con la Organización Mundial de la Salud normas por dosis humana única de un producto. La mayoría de los estudios clínicos que examinan la eficacia de aluminio de las vacunas con adyuvante se realizaron en los años 1930, 1940 y 1950, y los resultados varían dependiendo en los

antígenos involucrados (Volk y Bunney, 1942). Estos investigadores concluyeron que dos dosis del precipitado con el aluminio producen una respuesta inmune más duradera. En cuanto a la bioseguridad en el uso de vacunas que contienen aluminio se han asociado con una reacción local grave como eritema, subcutánea nódulos, hipersensibilidad de contacto y granulomatosa inflamación (Gupta et al., 1995). Se ha reportado que el hidróxido de aluminio atrae eosinófilos al sitio de inyección (Walls, 1977), pudiendo aumentar los niveles de anticuerpos IgE específicos del antígeno y el total de que pueden promover reacciones alérgicas mediadas por la IgE (Nagel et al., 1977). Por otro lado, adyuvantes de aluminio se han utilizado durante años para hiposensibilización de los pacientes alérgicos sin resultados adversos (Gupta et al., 1995). También ha habido informes, especialmente en pacientes con insuficiencia renal, de acumulación sistémica de aluminio, que se ha asociado con nervioso trastornos y enfermedades óseas.

Si bien es una buena estrategia combinar la FSH con polímeros o adyuvantes como el hidróxido de aluminio para retardar la acción de la FSH, estas formulaciones no son del todo seguras para utilizarlas en seres vivos. Esto se debe a que el PVP y PEG pertenecen al grupo de polímeros sintéticos los cuales al no ser biodegradables dejan residuos en los tejidos. A su vez, el hidróxido de aluminio al ser utilizado como adyuvante de vacunas se lo asocia con la producción de anticuerpos. Por lo tanto, una mejor opción a las ya propuestas sería la combinación de la FSH con polímeros biodegradables ya que no reaccionan en el tejido, lo que facilita su uso en animales (Swann y Kuo, 1991; Sutherland, 1991).

ACIDO HIALURONICO

Un polímero que es biocompatible y a su vez biodegradable, es el ácido hialurónico (AH) a menudo citado como hialuronato porque se lo encuentra en el mercado como hialuronato de sodio (por ejemplo MAP-5, Bioniche Animal Health Inc., Belleville, ON, Canada). Es un polímero natural perteneciente a la clase de los glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos ácidos). Es un polisacárido compuesto por unidades repetidas del disacárido formado por N-acetilglucosamina y glucuronato sódico unidos por enlaces glucosídicos alternantes. El hialuronato sódico está presente en diferentes tejidos del

cuerpo, pero está en mayor proporción en el líquido sinovial como “lubricante” de las articulaciones. Dentro del aparato reproductor, el hialuronato sódico se encuentra en el líquido folicular, en los fluidos del oviducto y útero. El mecanismo de acción y eficacia de estos productos dependen de las propiedades visco elásticas del hialuronato.

Historia

En 1934, Karl Meyer y su colega John Palmer lograron aislar una sustancia química hasta entonces desconocida a partir del cuerpo vítreo de los ojos de las vacas (Meyer y Palmer, 1934). Descubrieron que esta sustancia contenía dos moléculas de azúcar, una de las cuales era el ácido urónico. El nombre de ácido hialurónico proviene de "hialoide", que significa vítreo y de "ácido urónico".

En 1942, el ácido hialurónico fue utilizado por primera vez con fines comerciales cuando Endre Balazs solicitó patentar un proceso de utilización de este ácido como sucedáneo de la clara de huevo en los productos de pastelería. Tras ello, Endre Balazs utilizó las técnicas de Meyer para sintetizar el ácido de las crestas de los gallos (Meyer, 1947).

Distribución del AH en órganos y tejidos de mamíferos

Las mayores concentraciones de AH se encuentran en los tejidos conectivos típicos como cordón umbilical, líquido sinovial, piel y el cuerpo vítreo. Cantidades notables también están presentes en pulmón, riñón, cerebro y músculo, pero muy poco en el hígado. Dentro del aparato reproductor, el AH se encuentra en el líquido folicular, en los fluidos del oviducto y útero. Por otro lado, en el suero sanguíneo su concentración es muy baja. Con el desarrollo de métodos específicos y sensibles de histoquímica, ahora es posible conocer la distribución del AH en tejidos normales y enfermos (Laurent y Fraser, 1986).

Biosíntesis y orígenes celulares del AH

El AH se sintetiza en la membrana plasmática por una proteína unida a la membrana, cuyo código genético se ha determinado en bacterias de ratón y humanos (De Angelis y Weigel, 1995; Spicer et al., 1996; Watanabe y Yamaguchi, 1996).

Es casi seguro que la mayoría de las clases de vertebrados tienen células que sintetizan AH en algún momento de su vida. Esta capacidad puede ser reprimida o activada según las circunstancias como en el caso de las células del músculo liso. En el organismo maduro, la síntesis de AH está fuertemente expresada en las células del mesodermo, a pesar de que puede permanecer activo en otros, tales como los de la epidermis (Tammi et al., 1994). Es abundante en los fluidos de las articulaciones sinoviales, fundas de tendones y bursas. Se encuentra en pequeñas cantidades en el líquido de las serosas (pleura, pericardio y el peritoneo), y en planos de tejido definidos con menor movimiento, tal como las que existen entre músculo, órganos y la piel. Notablemente, persiste entre fibras individuales, husillos y septos en músculo esquelético y cardíaco, pero desaparece con la maduración de las fibras musculares lisas de lento movimiento (como en las paredes del intestino).

Metabolización del AH

Como se mencionó anteriormente, el AH se encuentra distribuido en gran cantidad de tejidos, donde se pensaba que ocurría la degradación del mismo; hasta que se demostró que los vasos linfáticos transportan considerable cantidades de AH al torrente sanguíneo (Laurent U y Laurent T, 1981). En tejidos densos, tales como el hueso y el cartílago, es probable que la mayor parte de la degradación del AH se dé por metabolización in situ al mismo tiempo que con el colágeno y proteoglicanos, ya que no hay drenaje linfático. En la piel y las articulaciones, alrededor de un 20-30% de la degradación del AH se produce por el metabolismo local y el resto se elimina por las vías linfáticas. La vida media del AH en los tejidos es de 12 horas a 2 o 3 días, independientemente de su vía de eliminación. Al llegar al torrente sanguíneo, alrededor del 85-90% se elimina en el hígado por el catabolismo de las células endoteliales sinusoidales. Los riñones eliminan un 10%, pero

sólo el 1-2% es eliminado por orina. En algunas especies, el bazo también tiene una alta participación en la eliminación del AH (Fraser y Laurent, 1989; Laurent and Fraser, 1991). Recientemente, se ha demostrado que los ganglios linfáticos tienen una capacidad considerable para la extracción y el catabolismo del AH (Fraser y Laurent, 1996). Cabe señalar que la especificidad del receptor para la metabolización del AH en el hígado es compartida con el sulfato de condroitina. Estudios de infusión en el torrente sanguíneo y ganglios linfáticos confirman que ambos comparten la misma vía catabólica (Fraser et al., 1997).

Funciones del AH

La propiedad más característica del AH es su visco-elasticidad. Tanto la viscosidad como la elasticidad no son constantes, sino que varían con la temperatura y la tensión cortante que se le aplica. Al comportarse como un fluido no-newtoniano, no tiene un valor de viscosidad definido y constante, a diferencia de un fluido newtoniano. La viscosidad de una solución al 1% de AH con un peso molecular de $3-4 \times 10^6$ es de aproximadamente 500 000 veces la del agua a baja velocidad de corte, pero puede caer 1000 veces cuando se ven obligados a través de una aguja fina (Fraser et al., 1997). El movimiento rápido reduce la viscosidad, que refleja la fuerza requerida para superar la fricción interna, y aumenta la elasticidad, la cual almacena energía y permite la recuperación de la deformación. La viscosidad del AH hace que éste polímero sea un lubricante biológico ideal, debido al menos por la reducción de la carga de trabajo durante los movimientos rápidos.

USO CLÍNICO DEL ÁCIDO HIALURÓNICO

Cultivo de embriones

Otro uso del AH es en el cultivo de embriones (Furnus et al., 1998; Palasz et al., 2006). El AH tiene la capacidad de elevar la viscosidad de los medios y regular las uniones y distribución del agua de la célula (Stojkovic et al., 1999). Se encontraron concentraciones de AH en células del cumulus en ovocitos en desarrollo y son correlacionados con el

desarrollo normal del embrión facilitando así su uso en cultivos (Ball et al., 1982; Tirone et al., 1997). Cuando se lo utilizó como reemplazo de proteínas en medios de cultivo para producir embriones bovinos in vitro, el desarrollo de blastocistos fue significativamente mayor que cuando se cultivaron embriones en medios que contienen albúmina sérica bovina (BSA; Furnus et al., 1998; Stojkovic et al., 2002). Además, estos embriones cuando se cultivaron en AH antes de su congelación mostraron menor daño celular después de la descongelación en comparación con los embriones cultivados en BSA. Curiosamente, cuando el AH se combinó con albúmina recombinante y citrato durante el cultivo de embriones bovinos fertilizados in vitro (FIV), las tasas de eclosión post- descongelación fueron significativamente mayores que los embriones cultivados en BSA o alcohol polivinílico respectivamente (60, 36.8, 5 %; Lane et al., 2003).

Asociado a fármacos para su liberación lenta

El hecho de que el AH es un polímero de origen natural, es decir, biocompatible, lo hace un candidato ideal para su uso como vehículo de diferentes drogas. El AH ha sido utilizado en combinación con diferentes fármacos como por ejemplo, taxol (Luo et al., 2000), superóxido dismutasa (Sakurai et al., 1997), factor de crecimiento similar a la insulina para uso en humanos (Morimoto et al., 2001) y dextrorubicina (Eliaz y Szoka, 2001). Por lo tanto el AH puede ser una alternativa interesante para ser asociado con FSH y así ser administrada en una o dos dosis.

HIPOTESIS

El tratamiento superestimulador con aplicaciones reducidas de FSH diluida en una formulación de liberación lenta a base de Hialuronato de Sodio (AH) resulta en una respuesta superovulatoria similar a la de los tratamientos tradicionales que utilizan 8 aplicaciones decrecientes distribuidas en 4 días.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con aplicaciones reducidas de FSH diluida en una formulación de liberación lenta a base de AH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con una única inyección de FSH diluido en una solución a base de AH y administrada por dos vías; intramuscular ó subcutánea en la base de la oreja (Experimento 1).

Evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con FSH diluida en dos concentraciones diferentes de AH (20 mg/ml o 10 mg/ml) y administrada en una única inyección intramuscular (Experimento 2).

Evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con una única inyección de FSH diluida en AH (20 mg/ml; Experimento 3).

Evaluar la respuesta superovulatoria de donantes Angus, Brangus y Bonsmara tratadas con distintas dosis de FSH diluida en AH y administrada en una única inyección intramuscular (Experimento 4).

Evaluar la respuesta superovulatoria en vacas para carne tratadas con FSH diluida en concentraciones bajas de AH (10 mg/ml o 5 mg/ml) administrado en dos aplicaciones cada 48 horas (tratamiento Split; Experimento 5).

Evaluar la respuesta superovulatoria en vacas donantes de embriones Angus tratadas con FSH diluida en AH (5 mg/ml) y administrado en dos aplicaciones intramusculares cada 48 horas, luego de haber sido refrigerada o congelada por dos semanas (Experimento 6).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOS

UBICACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO Y ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), ubicadas en la localidad de Estación General Paz, paraje pozo del Tigre.

Para los distintos experimentos, se utilizaron vacas adultas (3 a 5 años de edad) y vaquillonas de las razas Angus, Brangus y Bonsmara ciclando y con una condición corporal entre 3 y 4 (escala del 1 al 5). Durante el desarrollo de los experimentos los animales permanecieron en corrales de 15 x 35 metros, con una alimentación a base de rollo de alfalfa molido y concentrado (ACA Nutrición Animal; con 13% de proteína bruta, 3,5% materia grasa y 6% de minerales totales) dos veces por día y con disposición de agua ad libitum.

EXPERIMENTO 1

Se utilizaron 18 vacas de carne que se asignaron al azar en tres grupos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β (estradiol-17 β , Río de Janeiro, Laboratorios Allignani Hnos SRL, Argentina), además de 50 mg de progesterona (Progesterona Río de Janeiro, Laboratorios Allignani Hnos SRL, Argentina) y un dispositivo intravaginal impregnado de progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá). El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con uno de los siguientes tratamientos: Grupo 1 (Control) recibieron 400 mg de FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá) en dosis decrecientes por vía intramuscular (i.m.) cada 12 h durante 4 días (4 ml, 4 ml, 3 ml, 3 ml, 2 ml, 2 ml, 1 ml y 1 ml). Las vacas del Grupo 2 recibieron una dosis única de 400 mg de FSH por vía

subcutánea (s.c.) en la base de la oreja diluida en 10 ml de una formulación de liberación lenta a base de hialuronato de sodio (AH 20mg/ml, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá). Las vacas del Grupo 3 recibieron una dosis única de 400 mg de FSH por vía i.m. en la tabla del cuello, diluida en 10 ml de una solución de AH en la misma concentración que en el grupo anterior. En la mañana y la tarde del Día 6, todas las vacas recibieron 150 µg D (+) cloprostenol (PGF, Bioprost, Biotay, Argentina) y se retiró el Cue-Mate en la tarde del Día 6. En la mañana del Día 8, las vacas recibieron 12,5 mg de pLH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá) y fueron inseminadas 12 y 24 h más tarde. Las vacas que entraron en celo en la tarde del Día 7, fueron inseminadas en el momento de la pLH y 12 h más tarde. Los embriones se colectaron por método no quirúrgico en el Día 15 y fueron evaluados siguiendo las normas de la IETS (Stringfellow y Givens, 2010). En el día de la colecta las donantes recibieron una dosis de PGF.

EXPERIMENTO 2

El experimento se realizó en dos fases: la fase 1 se hizo con 15 donantes de la raza Aberdeen Angus que se asignaron al azar en dos grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los dos tratamientos. En la fase 2, se utilizaron 10 donantes de la raza Aberdeen Angus que se asignaron al azar en uno de los dos grupos de tratamiento. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimadas con 400 mg NHI-FSH-P1 de FSH diluida en 10 ml de AH en dos concentraciones 10 mg/ml o 20mg/ml que fue aplicado por vía i.m. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones fueron realizadas como en el experimento 1.

EXPERIMENTO 3

El experimento se realizó en dos fases: la fase 1 se hizo con 17 donantes de la raza Aberdeen Angus que se asignaron al azar en dos grupos en un diseño cross over, en donde

todas las vacas recibieron los dos tratamientos. En la fase 2, se utilizaron 24 donantes de la raza Aberdeen Angus que se asignaron al azar en uno de los dos grupos de tratamiento. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas en dos grupos de tratamiento: las vacas del Grupo 1 (Control) recibieron 400 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días. Las vacas del Grupo 2 (Dosis Simple) recibieron una dosis única de 400 mg de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/ml) y fue aplicado por vía i.m. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones fueron realizadas como en el experimento 1.

EXPERIMENTO 4

Experimento 4.1

Se utilizaron 24 vacas de la raza Angus, que se asignaron al azar en seis grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los seis tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con 200, 300 ó 400 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o en una única inyección de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/ml) y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones fueron realizadas como en los experimentos anteriores.

Experimento 4.2

Se utilizaron 12 vacas de la raza Brangus, que se asignaron al azar en seis grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los seis tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron

superestimuladas con 200, 260 ó 300 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o en una única inyección de FSH diluida en AH (20 mg/ml) y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en los experimentos anteriores.

Experimento 4.3

Se utilizaron 16 vacas de la raza Bonsmara, que se asignaron al azar en cuatro grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los cuatro tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con 200 ó 300 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o en una única inyección de FSH diluida en AH (20 mg/ml) y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en los experimentos anteriores.

EXPERIMENTO 5

Experimento 5.1

Se utilizaron 26 vacas para carne de razas *Bos taurus* que se asignaron al azar en dos grupos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas en dos grupos de tratamiento: las vacas del Grupo Control recibieron 400 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días. Las vacas del Grupo 2 (Dosis Split) recibieron 300 mg de FSH diluida en AH pero a una concentración de (10 mg/ml; MAP-5, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá) y 48 horas más tarde recibieron 100 mg de FSH diluida MAP-5 y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate,

inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en el experimento 1.

Experimento 5.2

Se utilizaron 14 vacas de la raza Brangus que se asignaron al azar en dos grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los dos tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas en dos grupos de tratamiento: las vacas del Grupo 1 (Control) recibieron 300 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días. Las vacas del Grupo 2 (Dosis Split) recibieron 200 mg de FSH diluida MAP-5 y 48 horas más tarde recibieron 100 mg de FSH diluida en MAP-5 y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en el experimento 1.

Experimento 5.3

Se utilizaron 29 vacas para carne de razas *Bos taurus* que se asignaron al azar en tres grupos en un diseño cross over, en donde todas las vacas recibieron los tres tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas en tres grupos de tratamiento: las vacas del Grupo 1 (Control) recibieron 300 mg de FSH en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días. Las vacas del Grupo 2 (Dosis Split 10 mg/mL) recibieron 200 mg de FSH diluida en MAP-5 y 48 horas más tarde recibieron 100 mg de FSH diluida en MAP-5 y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las vacas del Grupo 3 (Dosis Split 5 mg/mL) recibieron 200 mg de FSH diluida en AH pero en una concentración de 5 mg/ml (MAP-5 [50MG], Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canadá) y 48 horas más tarde recibieron 100 mg de FSH diluida en MAP-5 [50MG] y aplicada de igual manera que en el

Experimento 3. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en el experimento 1.

EXPERIMENTO 6

Se utilizaron 60 vacas de la raza Aberdeen Angus que se asignaron al azar en tres grupos de tratamientos. En el Día 0 (inicio del tratamiento), todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol-17 β , además de 50 mg de progesterona y un dispositivo intravaginal Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas en tres grupos de tratamiento: las vacas del Grupo 1 (Aplicación Inmediata) recibieron 200 mg de FSH diluida en MAP-5 [50MG] y 48 horas más tarde recibieron 100 mg de FSH diluida MAP-5 [50MG] y aplicada de igual manera que en el Experimento 3. Las vacas del Grupo 2 (Congelado) recibieron el mismo tratamiento que las vacas del Grupo 1 con la excepción de que la FSH diluida en AH fue preparada y congelada (-20°C) dos semanas previas al tratamiento. Las vacas del Grupo 3 (Refrigerado) recibieron el mismo tratamiento con la excepción de que la FSH diluida en AH fue preparada y refrigerada (3 a 5°C) dos semanas previas al tratamiento. Las aplicaciones de PGF, remoción del Cue-Mate, inseminaciones, colecta y clasificación de los embriones se realizaron como en el experimento 1.

ULTRASONOGRAFÍA

En todos los experimentos, las vacas fueron examinadas mediante ultrasonografía transrectal (Falco 100, con transductor de 8 mHZ, Pie-Medical, Holanda) en los Días 0 y 4 para verificar la presencia de un CL y tamaño y número de folículos mayores a 3 mm (Experimentos 1, 2, 3, 4, 5 y 6). En los experimentos 1, 2, 3 y 4, las vacas fueron examinadas diariamente durante el tratamiento superestimulador (Días 4 a 8) para determinar el perfil de crecimiento folicular y del Día 8 al Día 11 para determinar el número de ovulaciones. La respuesta ovulatoria fue confirmada por el número de CL en el Día 15, determinado por palpación rectal.

COLECCION Y CLASIFICACION DE EMBRIONES

Los embriones se colectaron por método no quirúrgico 7 días después de la aplicación de pLH. La colección de embriones consiste en realizar un lavado de útero mediante una sonda de dos vías por la cual se introduce medio de lavado (PBS, Pictor-Gen, Argentina) y ese mismo líquido cuando es retirado del útero se coloca en un filtro para embriones, el cual posee una malla de 50 μ (Millipore, Brasil), mientras que el embrión tiene un tamaño de entre 120 a 150 μ , por lo que el o los embriones quedan dentro del filtro. Al finalizar la colecta de embriones, el filtro es llevado al laboratorio para lavarlo y colocar su contenido dentro de una placa de petri y proceder a buscar los embriones mediante una lupa estereoscópica. Una vez finalizada la búsqueda de los embriones se procede a realizar la evaluación y clasificación de los mismos.

Los embriones fueron evaluados y clasificados siguiendo las normas de la IETS (Stringfellow y Givens, 2010). Para ello, la primer clasificación que se realiza es si la estructura colectada está o no fertilizada (embrión ú ovocito respectivamente). En caso de estar fertilizado, el embrión se clasifica de acuerdo a la integridad de sus células en embriones grado 1 (más de 80% de células intactas), grado 2 (entre 50 a 80% de células intactas), grado 3 (menos de 50% de células intactas) ó degenerado (grado 4) que es cuando el embrión por alguna razón detuvo su desarrollo (menos de 32 células) y/o sus células están degeneradas y disgregadas.

ANALISIS ESTADISTICO

La respuesta superovulatoria se evaluó por el número de CL contados a la palpación rectal, y por el número y calidad de los embriones obtenidos. Los datos provenientes de conteos como número de estructuras (ovocitos/embriones) totales colectadas, embriones fertilizados y transferibles grado 1, 2 y 3, fueron primero transformados por la raíz cuadrada mientras que los datos provenientes de proporciones, como los porcentajes de ovocitos fertilizados, embriones grado 1, 2 y 3 fueron transformados por arcoseno.

En el Experimento 1, luego de realizar la transformación de los datos obtenidos, éstos fueron analizados por ANAVA utilizando el software Infostat® (Infostat, 2008). En los Experimentos 2, 3, 5 y 6 una vez transformados los datos fueron analizados por ANAVA para modelos mixtos en donde se tomó al tratamiento como variable fija y vaca (RP) como variable aleatoria (Infostat, 2008). En el Experimento 4 la respuesta superovulatoria (por ejemplo número de CL) y datos de ovocitos/embriones fueron analizados por ANAVA para modelos mixtos en donde se tomó tratamiento y dosis como variables fijas y vaca (RP) como variable aleatoria (Infostat, 2008). Cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el test LSD para realizar las comparaciones de a pares teniendo un $P < 0,05$ como diferencia significativa (Infostat, 2008).

En todos los experimentos se analizaron los datos de patrones de crecimiento folicular (3 a 5 mm, 6 a 8 mm y ≥ 9 mm de diámetro) por ANAVA para modelos mixtos utilizando tratamiento y día como variables fijas (con sus interacciones) y vaca (RP) como variable aleatoria (Infostat, 2008).

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Los resultados del Experimento 1 se encuentran resumidos en la Tabla 3.1. El número total de CL fue mayor ($P < 0.05$) en las vacas que recibieron 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días (Grupo Control) o una sola aplicación de 400 mg de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/mL) aplicada por vía i.m. que las vacas tratadas con una sola aplicación de 400 mg de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/mL) aplicada por vía s.c. en la base de la oreja. El número total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles fue mayor ($P < 0,05$) en las vacas del Grupo Control que las vacas que recibieron una sola aplicación de 400 mg de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/mL) aplicada por vía s.c. en la base de la oreja, mientras que las vacas que recibieron una sola aplicación de 400 mg de FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/mL) por vía i.m. fueron intermedias.

Tabla 3.1. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas de carne tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 10 ml de AH (20 mg/mL) y aplicada por vía i.m. o s.c. en la base de la oreja

Grupos	N	CL	Ovocitos /embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones transferibles
Control	6	13,2 \pm 3,1 ^a	12,7 \pm 4,0 ^a	10,8 \pm 3,8 ^a	10,3 \pm 3,4 ^a
Dosis Simple i.m.	6	11,0 \pm 2,0 ^a	8,2 \pm 2,0 ^{ab}	5,8 \pm 1,7 ^{ab}	5,0 \pm 1,7 ^{ab}
Dosis Simple s.c.	6	4,2 \pm 1,0 ^b	2,0 \pm 1,4 ^b	1,3 \pm 1,1 ^b	1,3 \pm 1,1 ^b
Valor P		0,0288	0,0443	0,0511	0,0466

^{ab} Medias con distintas letras son diferentes.

En la Figuras 3.1 y 3.2 se muestran los patrones de crecimiento de los folículos de 3 a 5 mm y 6 a 8 mm de diámetro respectivamente, en donde podemos apreciar que no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos a lo largo de los días del tratamiento superestimulador ($P > 0,05$).

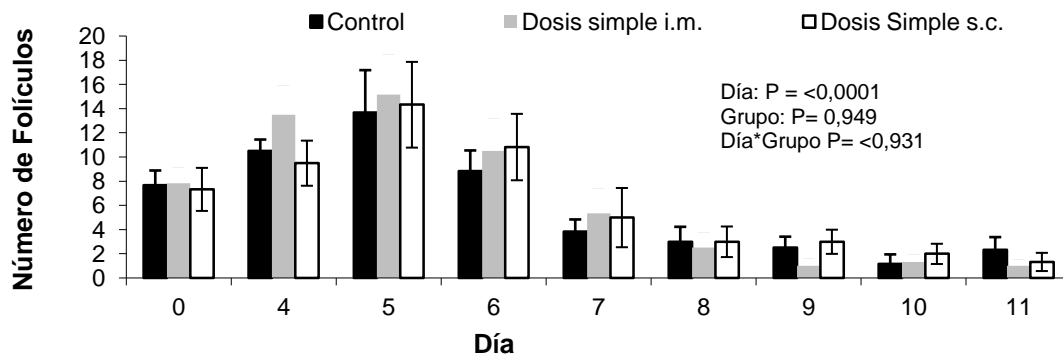


Figura 3.1. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.

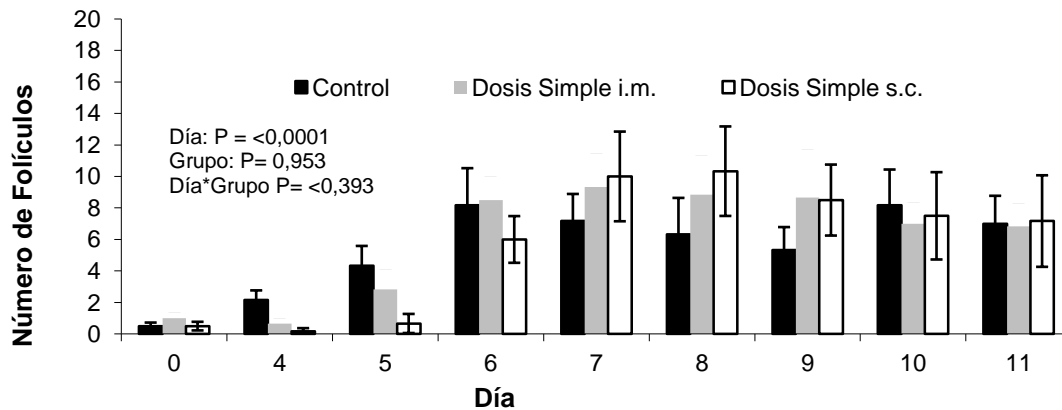
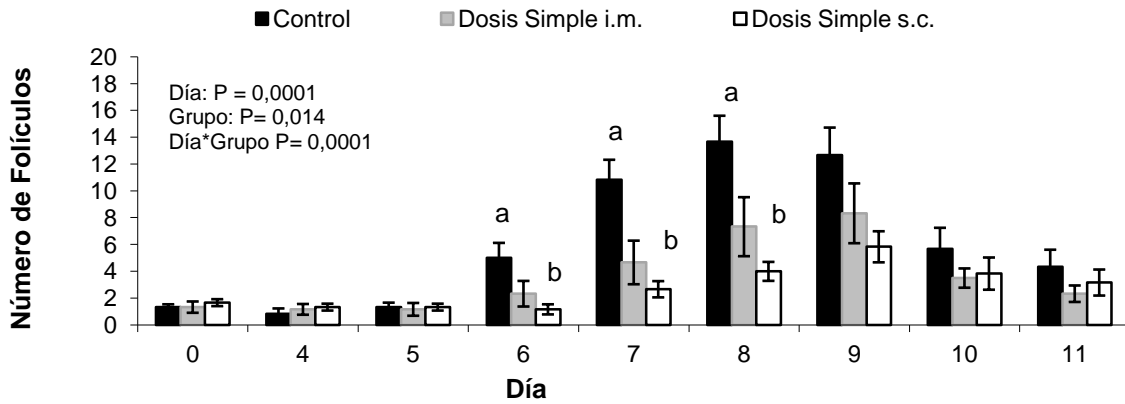


Figura 3.2. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm de diámetro durante y después del tratamiento superestimuladorio.

Por otro lado, en la figura 3.3 se muestran los folículos ≥ 9 mm de diámetro a lo largo del tratamiento superestimuladorio, en donde se observa una mayor cantidad de folículos a favor del Grupo Control versus los dos grupos de dosis reducida ($P=0,014$) durante los días 6, 7 y 8 de tratamiento.



^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Figura 3.3. Número promedio de folículos ≥ 9 mm durante y después del tratamiento super estimulatorio.

EXPERIMENTO 2

Fase 1

Aunque el número promedio (\pm EE) de CL no difirió entre los grupos de tratamiento ($P=0,3$), el número de ovocitos/embriones colectados y los embriones transferibles fueron mayores ($P<0,05$) en las vacas que recibieron 400 mg de FSH diluidos en 20 mg/mL de la solución de AH. A su vez, el número de ovocitos fertilizados tendió ($P=0,06$) a ser mayor en las vacas que recibieron 400 mg de FSH diluidos en 20 mg/ml de la solución de AH (Tabla 3.2). Solamente una vaca en cada uno de los grupos tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Sin embargo, 6 de 15 vacas (40%) en el grupo 10 mg/ml no produjo ningún embrión transferible, mientras que todas las vacas del grupo 20 mg/mL produjeron al menos 1 embrión transferible.

Tabla 3.2. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL ó 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ Embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones Transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
10 mg/mL	15	10,7 \pm 1,5	7,2 \pm 1,4	5,3 \pm 1,4	3,2 \pm 0,9	6 (40%)
20 mg/mL	15	12,1 \pm 1,3	11,2 \pm 1,0	7,3 \pm 0,7	5,7 \pm 0,7	0 (0%)
Valor P		0,2916	0,0501	0,066	0,0133	0,0062

La tabla 3.3, muestra el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación de la FSH (Día 4), el número de ovulaciones y la hora promedio de ovulación luego de la aplicación de pLH. No se encontraron diferencias entre los grupos en ninguno de los parámetros evaluados.

Tabla 3.3. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH con una sola aplicación de FSH diluida en 10 mg/mL ó 20 mg/mL de AH.

Grupos	Folículos 3-5 mm	Ovulaciones	Tiempo promedio de ovulación (h)
10 mg/mL	17,4 \pm 1,8	11,3 \pm 1,4	32,6 \pm 2,3
20 mg/mL	19,3 \pm 1,4	13,6 \pm 1,1	30,8 \pm 1,4
Valor P	0,4685	0,2829	0,5817

Cuando se analizó el diámetro promedio de todos los folículos \geq 3 mm de diámetro durante todos los días de tratamiento se encontró una interacción día por grupo de tratamiento ($P=0,0008$) que se atribuyó a un mayor diámetro folicular en las vacas del grupo 10 mg/mL en los días 10 y 11.

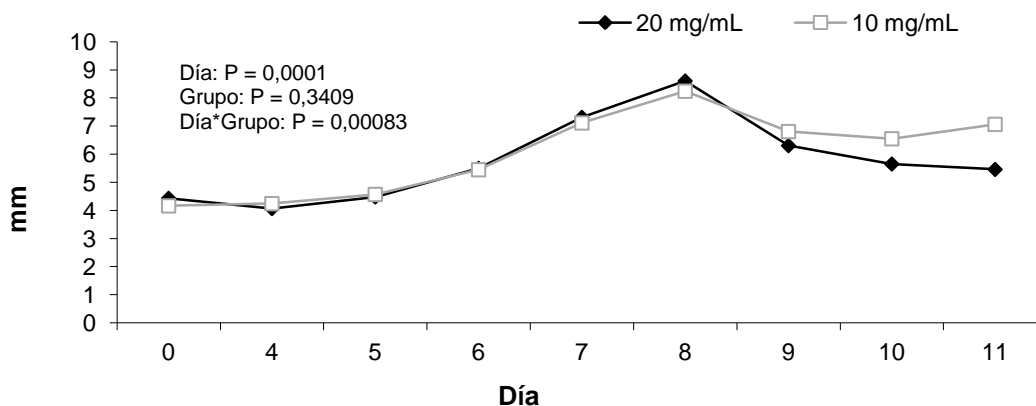


Figura 3.4. Diámetro promedio de todos los folículos \geq 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovulatorio.

En la Figuras 3.5, 3.6 y 3.7 se muestran los patrones de crecimiento de los folículos de 3 a 5 mm, 6 a 8 mm y \geq 9 mm de diámetro respectivamente, en donde no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos a lo largo de los días del tratamiento superestimuladorio ($P>0,05$).

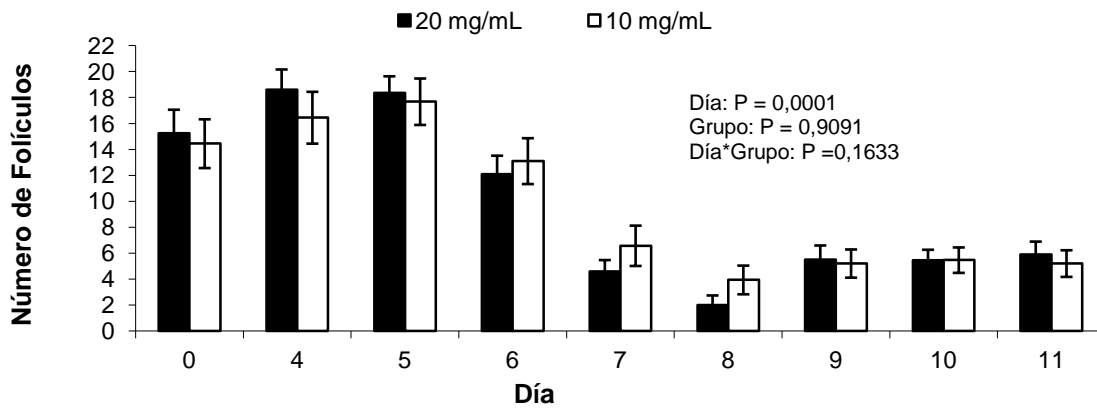


Figura 3.5. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

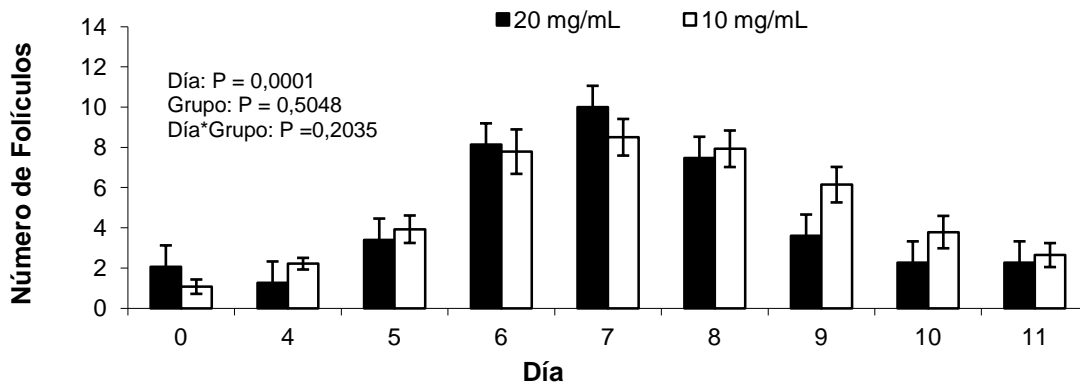


Figura 3.6. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

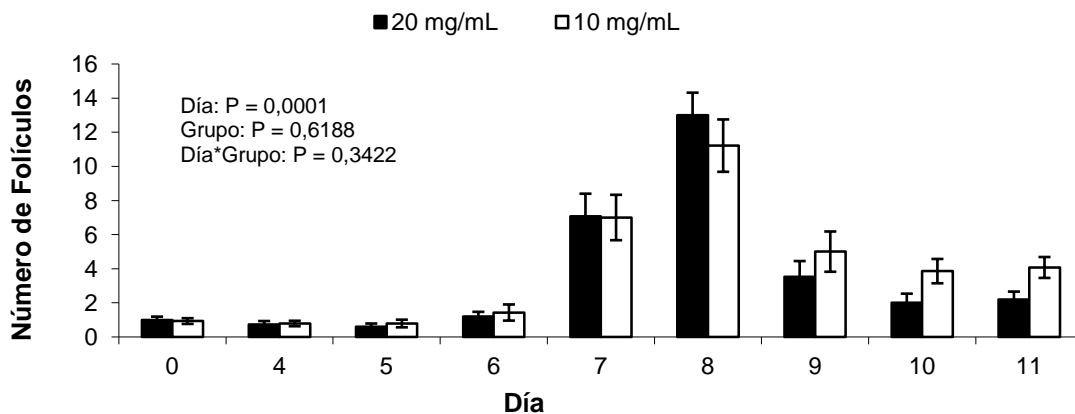


Figura 3.7. Número promedio de folículos de ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

Fase 2

Aunque el número de CL (\pm EE) tendió a ser diferente ($P=0,08$), el número total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles fueron significativamente mayores en las vacas tratadas con 20 mg/mL ($P<0,05$; Tabla 3.4). Sólo una vaca en el grupo 10 mg/mL tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, 2 de 5 vacas (40%) en el grupo 10 mg/mL no produjeron ningún embrión transferible, mientras que todas las vacas del grupo 20 mg/mL produjeron al menos 1 embrión transferible.

Tabla 3.4. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL ó 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
10 mg/mL	5	6,8 \pm 2,3	3,8 \pm 1,9 ^a	2,8 \pm 1,7 ^a	2,2 \pm 1,2 ^a	2 (40%)
20 mg/mL	5	14,0 \pm 2,3	12,0 \pm 1,5 ^b	10,8 \pm 1,2 ^b	10,2 \pm 1,7 ^b	0 (0%)
Valor P		0,0791	0,0147	0,0099	0,0084	0,1138

^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Resultados Generales del Experimento 2

Aunque el número de CL (\pm EE) tendió a ser diferente ($P=0,1$), el número total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles fueron significativamente mayores en las vacas tratadas con 20 mg/mL ($P<0,005$; Tabla 3.5). Sólo dos vacas en el grupo 10 mg/mL y una vaca en el grupo 20 mg/mL tuvieron ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, 8 de 20 vacas (40%) en el grupo 10 mg/mL no produjeron ningún embrión transferible, mientras que todas las vacas del grupo 20 mg/mL produjeron al menos 1 embrión transferible.

Tabla 3.5. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH diluida en dos concentraciones de AH (20 mg/mL ó 10 mg/mL) y aplicada por vía i.m. en la tabla del cuello.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
10 mg/mL	20	9,7 \pm 1,3	7,1 \pm 1,4 ^a	4,6 \pm 1,1 ^a	2,9 \pm 0,7 ^a	8 (40%)
20 mg/mL	20	12,5 \pm 1,1	11,5 \pm 0,9 ^b	8,2 \pm 0,7 ^b	6,8 \pm 0,8 ^b	0 (0%)
Valor P		0,0999	0,0147	0,0102	0,0008	0,0016

^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

La tabla 3.6, muestra el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación de FSH (Día 4), el número de ovulaciones y la hora promedio de ovulación luego de la aplicación de pLH. No se encontraron diferencias entre los grupos en ninguno de los parámetros evaluados.

Tabla 3.6. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH con una sola aplicación de FSH diluida en 10 mg/mL ó 20 mg/mL de AH.

Grupos	Folículos 3-5 mm	Ovulaciones	Tiempo promedio de ovulación (h)
10 mg/mL	16,4 \pm 1,6	10,4 \pm 1,4	30,1 \pm 2,6
20 mg/mL	18,6 \pm 1,5	13,2 \pm 1,1	30,8 \pm 1,3
Valor P	0,3286	0,1208	0,8155

Las características de los folículos durante los días de tratamiento se muestran en las Figuras 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11. Cuando se analizó el diámetro promedio de todos los folículos \geq 3 mm de diámetro durante todos los días de tratamiento se encontró una hubo una tendencia en la interacción día por tratamiento (P=0,07) que se atribuyó a un mayor diámetro folicular en las vacas del grupo 10 mg/mL en los días 10 y 11 (Figura 3.8).

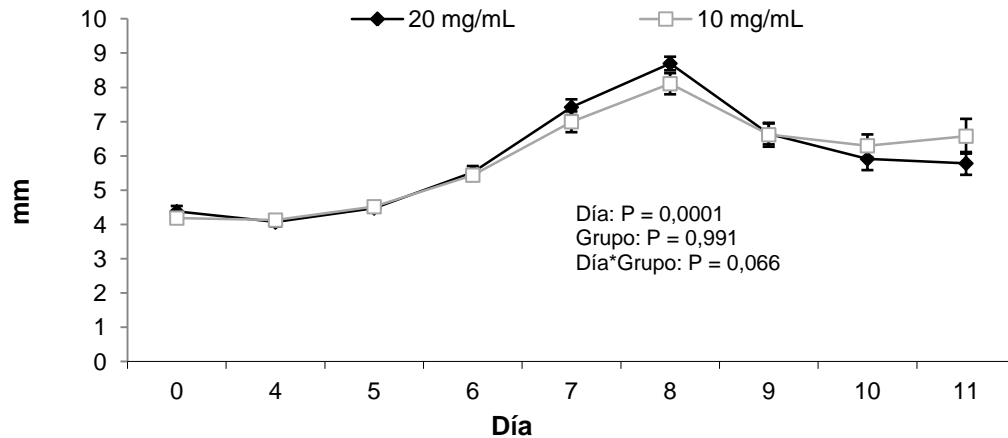


Figura 3.8. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovulatorio.

Por otro lado cuando se analizaron los patrones de crecimiento de los folículos de 3 a 5 y de 6 a 8 mm de diámetro no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a lo largo del tratamiento ($P > 0,05$; Figuras 3.9 y 3.10 respectivamente). A su vez, hubo una tendencia en la interacción día por tratamiento en los folículos ≥ 9 mm de diámetro ($P = 0,08$; Figura 3.11) en favor de las vacas tratadas con 20 mg/mL de AH.

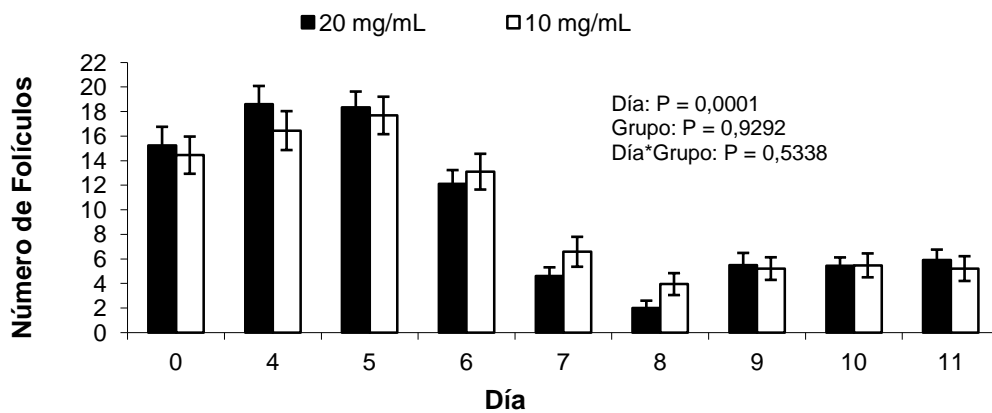


Figura 3.9. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

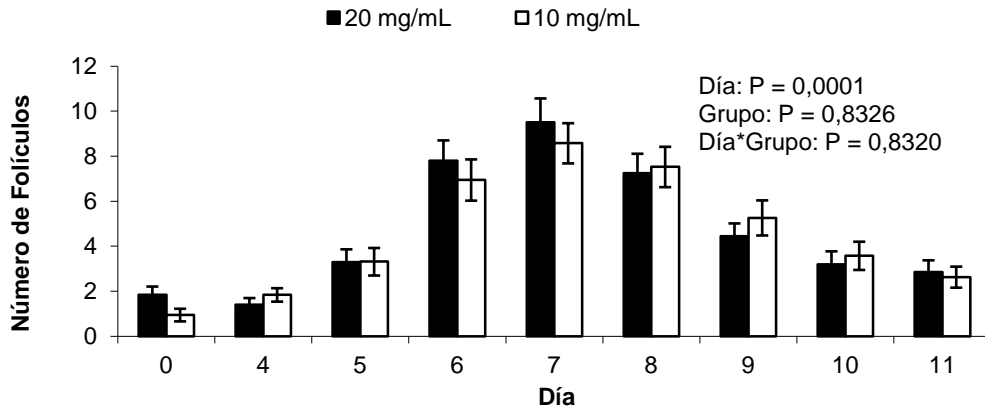


Figura 3.10. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

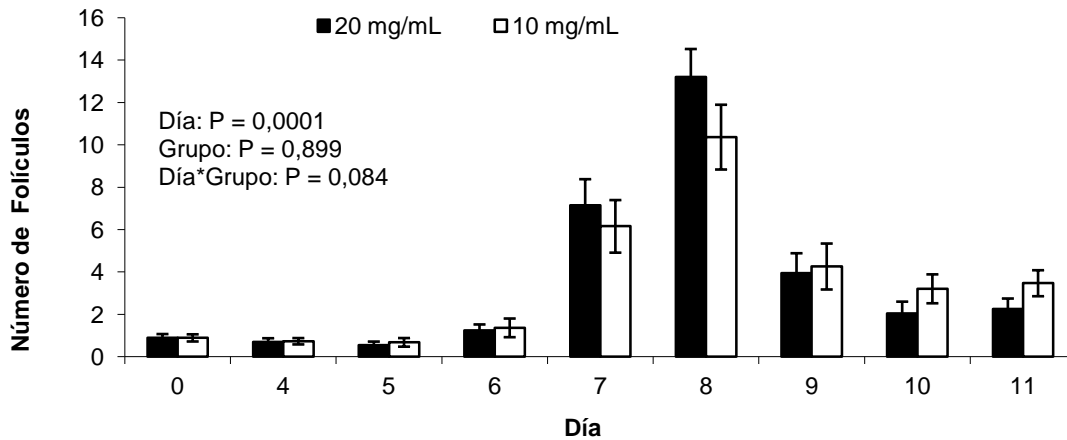


Figura 3.11. Número promedio de folículos de ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

EXPERIMENTO 3

Fase 1

El número de CL, total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento ($P > 0,05$; Tabla 3.7). Sólo una vaca en el grupo Dosis Simple tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, solamente dos vacas en cada uno de los grupos de tratamiento no produjeron ningún embrión transferible.

Tabla 3.7. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con “0” embriones transferibles
Control	17	15,2 \pm 1,6	14,7 \pm 2,0	8,2 \pm 1,6	5.9 \pm 1.2	2 (11,7%)
Dosis Simple	17	14,8 \pm 1,8	16,6 \pm 3,0	8,6 \pm 2,0	7.1 \pm 1.8	2 (11,7%)
Valor P		0,7057	0,8947	0,8545	0,8005	1,0000

La Tabla 3.8, muestra el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación de FSH (Día 4), el número de ovulaciones y la hora promedio de ovulación luego de la aplicación de pLH. No se encontraron diferencias entre los grupos en ninguno de los parámetros evaluados.

Tabla 3.8. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH en vacas Angus tratadas con dosis decrecientes de FSH durante 4 días ó una sola aplicación de FSH diluida en 20 mg/mL de AH.

Grupos	Folículos 3-5 mm	Ovulaciones	Tiempo promedio de ovulación (h)
Control	19,6 \pm 1,5	15,8 \pm 1,3	31,3 \pm 2,3
Dosis Simple	17,6 \pm 1,3	14,5 \pm 1,7	35,1 \pm 2,3
Valor P	0,4851	0,5502	0,2625

En la Figura 3.12 se muestra el diámetro promedio de todos los folículos \geq 3 mm de diámetro durante todos los días de tratamiento, en donde no se encontraron diferencias entre ambos grupos de tratamiento ($P > 0,05$). Lo mismo ocurrió cuando se analizaron los folículos de 3 a 5 mm, 6 a 8 mm y folículos \geq 9 mm de diámetro ($P > 0,05$; Figuras 3.13, 3.14 y 3.15 respectivamente).

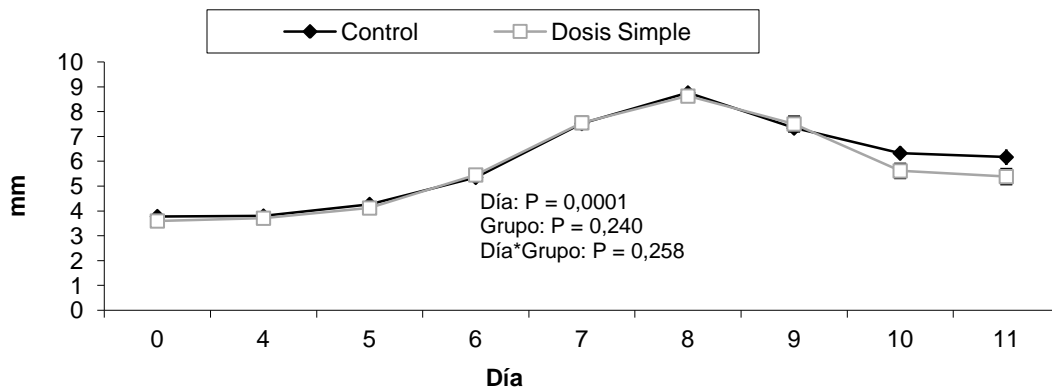


Figura 3.12. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovulatorio.

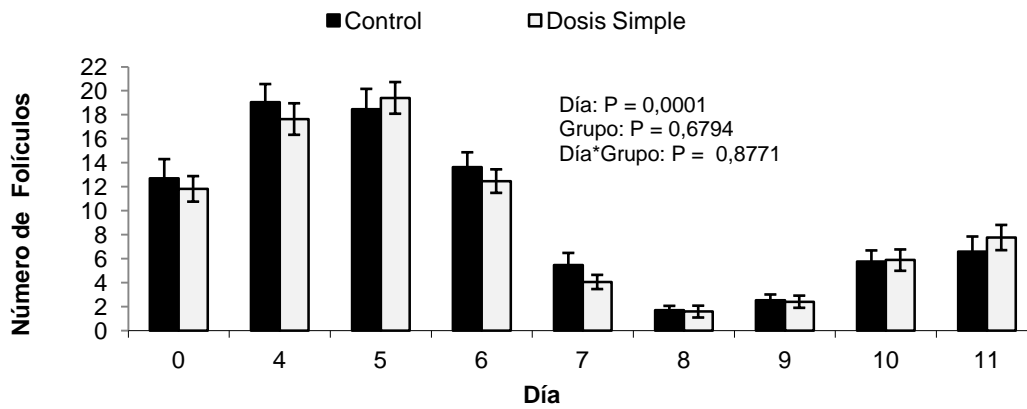


Figura 3.13. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

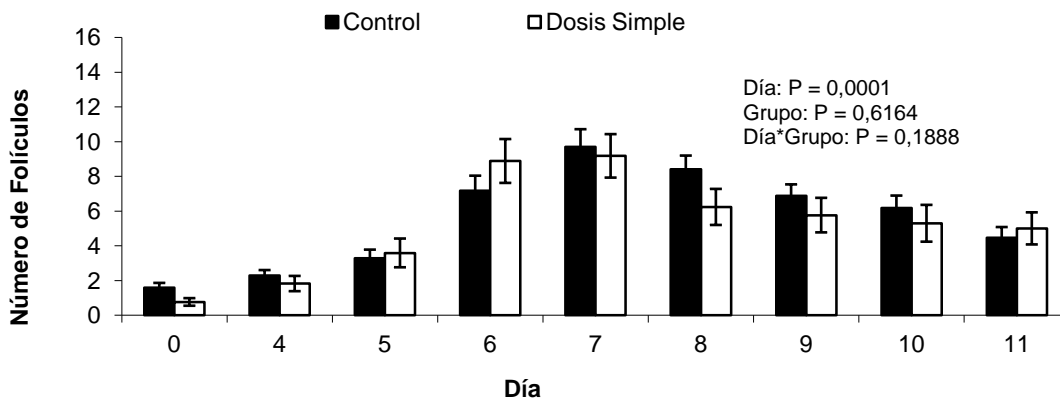


Figura 3.14. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

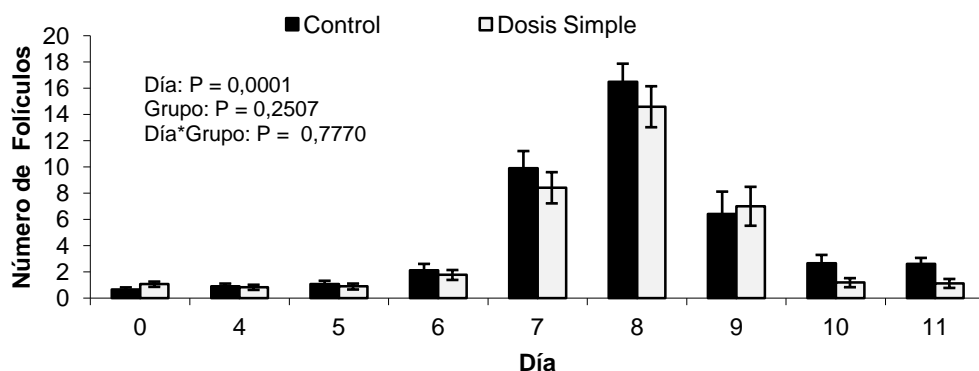


Figura 3.15. Número promedio de folículos de ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

Fase 2

No se encontraron diferencias significativas en el número de CL, total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles entre los grupos de tratamiento ($P > 0,05$; Tabla 3.9). Sólo una vaca en el grupo Control tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, solamente una vaca en el grupo Control y dos vacas en el grupo Dosis Simple no produjeron ningún embrión transferible.

Tabla 3.9. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	12	11,5 \pm 1,7	8,8 \pm 2,0	5,8 \pm 1,5	4,5 \pm 1,2	1
Dosis Simple	12	12,2 \pm 1,6	9,6 \pm 2,3	8,1 \pm 2,1	7,1 \pm 1,9	2
Valor P		0,7486	0,8093	0,3926	0,2700	0,5371

Resultados Generales del Experimento 3

El número de CL, total de ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes estadísticamente entre los grupos de tratamiento ($P > 0,05$; Tabla 3.10). Sólo una vaca en cada uno de los grupos de tratamiento tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, solamente una vaca en el grupo Control y dos vacas en el grupo Dosis Simple no produjeron ningún embrión transferible.

Tabla 3.10. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única de 400 mg FSH diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con “0” embriones transferibles
Control	29	13,7 \pm 1,2	12,3 \pm 1,5	7,2 \pm 1,1	5,3 \pm 0,8	3 (10,3%)
Dosis Simple	29	13,8 \pm 1,2	13,7 \pm 2,1	8,4 \pm 1,4	7,1 \pm 1,3	4 (13,8%)
Valor P		0,9635	0,935	0,6477	0,4318	0,5846

EXPERIMENTO 4

EXPERIMENTO 4.1

Los efectos principales de tratamiento se indican en la Tabla 3.11, y todos los grupos de tratamientos se muestran en la Tabla 3.12. Aunque el número de CL fue diferente ($P < 0,01$) entre los grupos Control y Dosis Simple, el número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes ($P > 0,2$; Tabla 3.11). Sólo una vaca en cada uno de los grupos de tratamiento tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, 9 vacas en cada uno de los grupos no produjeron ningún embrión transferible. Las vacas tratadas con 400 mg y 300 mg de FSH tenían más CL, ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles que las vacas que recibieron 200 mg ($P < 0,05$). Los resultados mostrados en la Tabla 3.12 indican que se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en el número de CL, número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados. No se encontraron diferencias significativas en el número total de embriones transferibles.

Tabla 3.11. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/ Embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control		69	13,3 \pm 0,6 ^a	11,3 \pm 0,6	8,4 \pm 0,7	5,6 \pm 0,5	9
Dosis Simple		69	11,1 \pm 0,6 ^b	10,3 \pm 0,9	7,8 \pm 0,7	5,4 \pm 0,6	9
Valor P			0,0003	0,2248	0,4296	0,7962	1,000
	400	46	14,3 \pm 0,7 ^b	13,9 \pm 1,1 ^b	9,8 \pm 1,0 ^b	6,5 \pm 0,7 ^b	5
	300	46	13,1 \pm 0,7 ^b	12,0 \pm 1,0 ^b	9,4 \pm 0,9 ^b	6,1 \pm 0,7 ^b	5
	200	46	9,2 \pm 0,7 ^a	6,6 \pm 0,7 ^a	5,2 \pm 0,6 ^a	4,0 \pm 0,5 ^a	8
Valor P			0,0001	0,0001	0,0001	0,016	0,5627

^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Tabla 3.12. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupo.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	400	23	15,6 \pm 1,0 ^d	14,1 \pm 1,5 ^b	10,2 \pm 1,6 ^c	6,5 \pm 1,1	3
	300	23	14,0 \pm 0,7 ^{cd}	12,4 \pm 1,3 ^b	9,0 \pm 1,1 ^{bc}	5,7 \pm 0,9	3
	200	23	10,4 \pm 1,1 ^{ab}	7,4 \pm 1,1 ^a	6,0 \pm 0,9 ^{ab}	4,6 \pm 0,8	3
Dosis Simple	400	23	13,0 \pm 0,9 ^c	13,7 \pm 1,8 ^b	9,3 \pm 1,3 ^{bc}	6,5 \pm 1,0	2
	300	23	12,2 \pm 1,1 ^{bc}	11,3 \pm 1,5 ^b	9,7 \pm 1,5 ^b	6,4 \pm 1,1	2
	200	23	8,0 \pm 1,0 ^a	5,7 \pm 0,9 ^a	4,3 \pm 0,7 ^a	3,4 \pm 0,7	5
Valor P			0,0001	0,0001	0,0007	0,0757	0,8063

^{abcd} Medias con diferentes letras son diferentes.

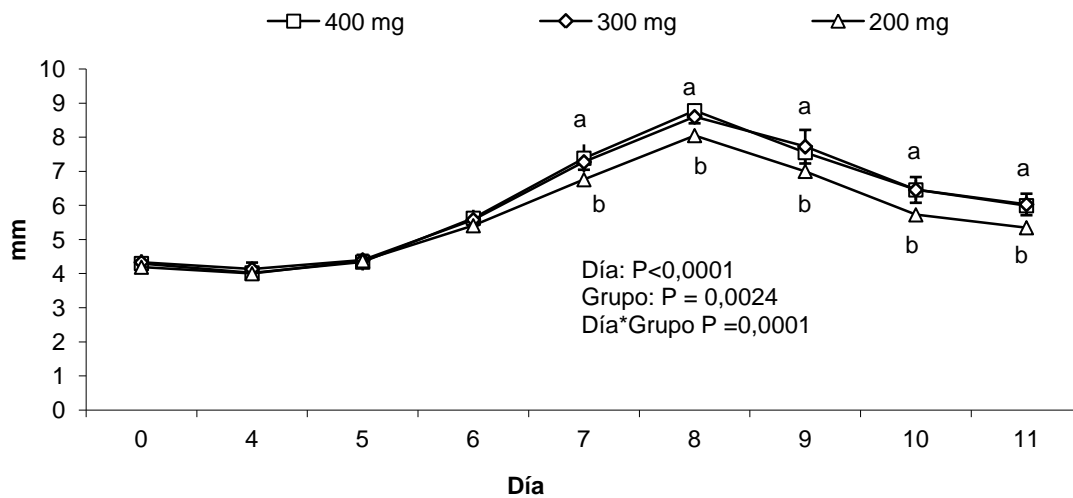
La Tabla 3.13, muestra el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación de FSH (Día 4), el número de ovulaciones y la hora promedio de ovulación luego de la aplicación de pLH. No se encontraron diferencias en el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro y en el número y momento de ovulación entre los tratamientos Control y Dosis Simple ni interacción tratamiento por dosis en ninguno de los parámetros evaluados ($P > 0,05$; Tabla 3.13). Sin embargo, hubo un efecto de dosis significativo ($P < 0,01$) en el número de ovulaciones, debido a una mayor cantidad de ovulaciones en las vacas que recibieron 400 y 300 mg que en las que recibieron 200 mg de FSH.

Tabla 3.13. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4), número y tiempo de ovulaciones luego de la administración de pLH en vacas Angus tratadas con 400, 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis (mg)	N	Folículos 3-5 mm	Ovulaciones	Hora promedio de ovulación (h)
Control		69	15,0 \pm 0,7	11,0 \pm 0,6	34,8 \pm 1,1
Dosis Simple		69	14,1 \pm 0,7	10,3 \pm 0,7	34,1 \pm 1,2
Valor P			0,3303	0,4492	0,6991
	400	46	15,3 \pm 1,0	12,7 \pm 0,8 ^b	32,2 \pm 1,2
	300	46	14,4 \pm 0,8	11,5 \pm 0,8 ^b	36,7 \pm 1,4
	200	46	13,9 \pm 0,7	7,7 \pm 0,5 ^a	34,5 \pm 1,5
Valor P			0,4839	0,0001	0,078

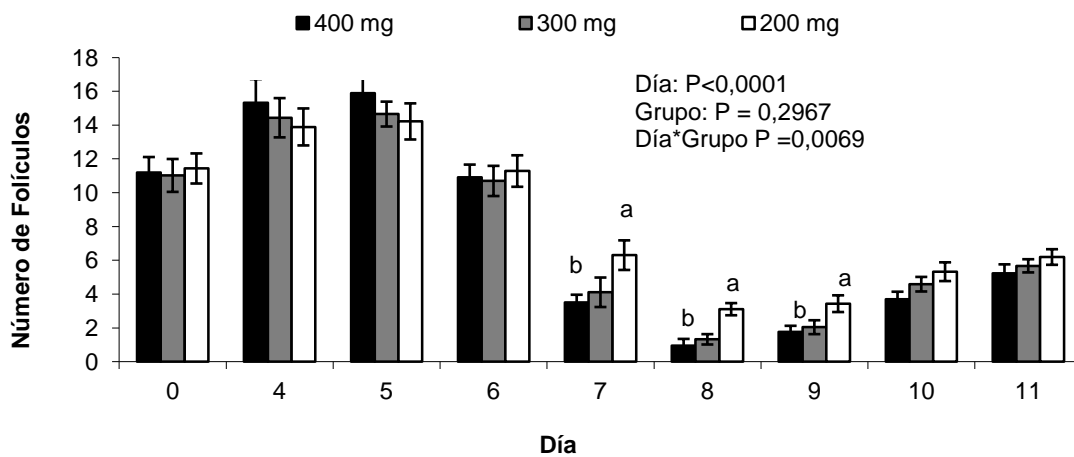
^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

En el análisis de las características de los folículos durante los días de tratamiento no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos Dosis Simple y Control ni interacciones día por tratamiento y día por dosis por tratamiento (por lo tanto los datos no se muestran). No obstante, si se encontraron diferencias entre las distintas dosis y ellas se muestran en las Figuras 3.16, 3.17, 3.18 y 3.19. Hubo interacción entre día por tratamiento en diámetro folicular promedio de todos los folículos \geq 3 mm de diámetro (Figura 3.16), debido a un mayor diámetro promedio en las vacas tratadas con 400 y 300 mg de FSH con dos aplicaciones diarias de FSH (Control) que las vacas que recibieron 200 mg de FSH en una Dosis Simple entre los días 7 a 11 de tratamiento. Los demás grupos de tratamiento fueron intermedios. También se encontró una interacción día por tratamiento en los folículos de 3 a 5 mm (Figura 3.17), folículos de 6 a 8 mm (Figura 3.18) y en folículos \geq 9 mm de diámetro (Figura 3.19). Había más folículos de 3 a 5 mm de diámetro en las vacas tratadas con 200 mg de FSH con una sola aplicación que en los demás grupos en los días 7 a 9 de tratamiento. Se observaron más folículos de 6 a 8 mm de diámetro en las vacas tratadas con 400 y 300 mg de FSH administradas en dos inyecciones diarias (Control) que en aquellas vacas que recibieron 200 mg tanto en una Dosis Simple como en dos inyecciones diarias (Control) entre los días 6 a 11 de tratamiento. Por último, hubo un mayor número de folículos \geq 9 mm de diámetro en las vacas tratadas con 400 y 300 mg de FSH tratadas con dos inyecciones diarias como con una sola aplicación que las vacas tratadas con 200 mg de FSH en dos aplicaciones diarias o en una sola aplicación en el día 8.



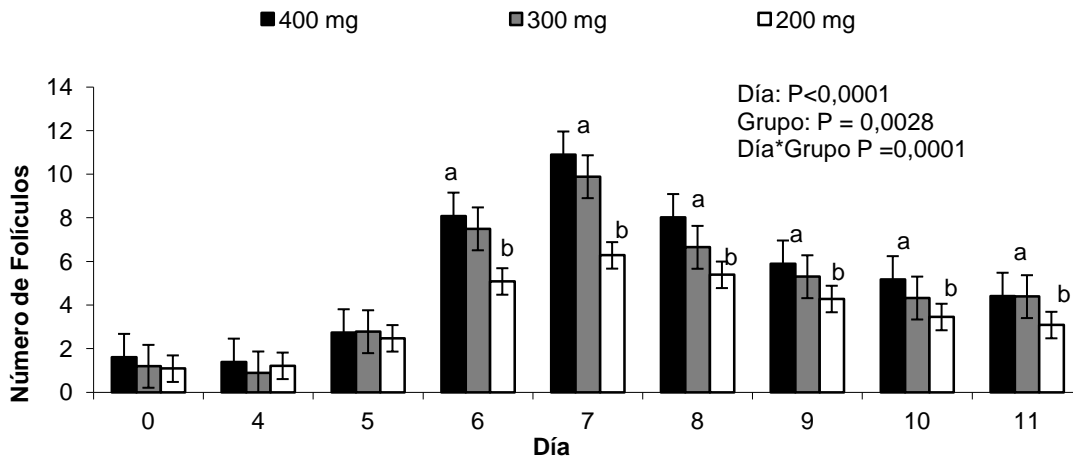
^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Figura 3.16. Diámetro promedio de todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro durante y después del tratamiento superovulatorio.



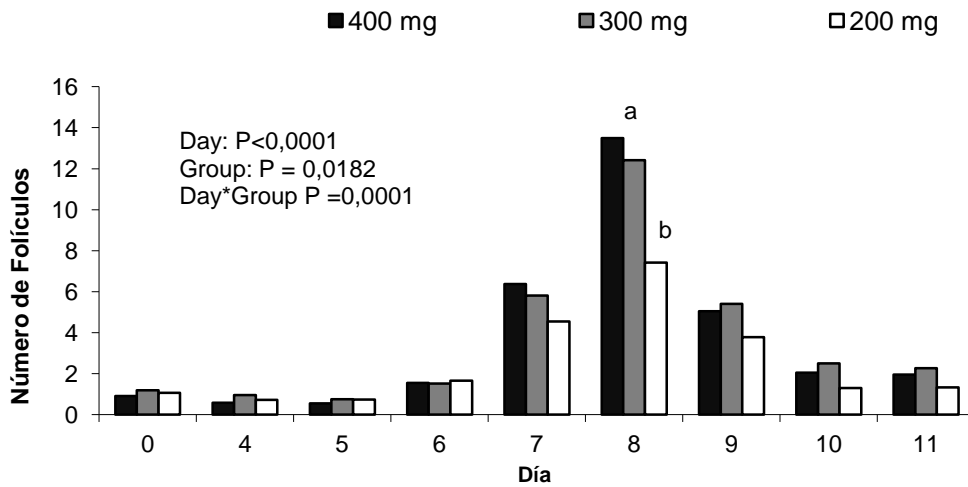
^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Figura 3.17. Número promedio de folículos de 3 a 5 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.



^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Figura 3.18. Número promedio de folículos de 6 a 8 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.



^{ab} Medias con diferentes letras son diferentes.

Figura 3.19. Número promedio de folículos de ≥ 9 mm durante y después del tratamiento superovulatorio.

EXPERIMENTO 4.2

Aunque el número de CL tendió a ser diferente ($P=0,07$) entre los grupos Control y Dosis Simple, el número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes ($P>0,1$; Tabla 3.14). Sólo dos vacas en el grupo Control y siete en el grupo Dosis Simple no produjeron ningún embrión transferible, lo que mostró

una tendencia a favor de las vacas del grupo Control ($P=0,07$). Las vacas tratadas con 260 mg de FSH produjeron más embriones transferibles que las vacas que recibieron 200 mg de FSH ($P=0,05$), mientras que las vacas que fueron tratadas con 300 mg fueron intermedias y no difirieron de los otros dos grupos. Para el resto de las variables analizadas no se encontraron diferencias significativas ($P>0,1$). En la Tabla 3.15 se encuentran los resultados de cada uno de los grupos de tratamiento. Si bien no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas ($P>0,2$), se observa que las vacas tratadas con 260 mg de FSH, ya sea en Dosis Simple como múltiples (Control), tuvieron una diferencia numérica con respecto a los demás grupos.

Tabla 3.14. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control		36	16,2 \pm 1,4	15,8 \pm 1,7	10,1 \pm 1,2	7,3 \pm 1,0	2
Dosis Simple		36	13,0 \pm 1,2	12,7 \pm 1,9	8,9 \pm 1,3	7,3 \pm 1,2	7
	Valor P		0,0706	0,1136	0,3272	0,5361	0,0748
	300	24	16,4 \pm 1,7	15,5 \pm 2,1	9,3 \pm 1,5	7,9 \pm 1,5 ^{ab}	5
	260	24	15,2 \pm 1,5	15,7 \pm 2,0	12,0 \pm 1,8	9,5 \pm 1,6 ^b	1
	200	24	12,2 \pm 1,6	11,6 \pm 2,4	7,1 \pm 1,1	5,2 \pm 0,8 ^a	3
	Valor P		0,1584	0,2258	0,1355	0,0560	0,2179

Tabla 3.15. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupos.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	300	12	18,2 \pm 2,7	17,7 \pm 3,2	10,0 \pm 2,0	7,7 \pm 1,8	1
	260	12	16,7 \pm 2,1	17,8 \pm 2,8	12,8 \pm 2,6	9,1 \pm 1,8	0
	200	12	13,7 \pm 2,3	11,9 \pm 2,5	7,3 \pm 1,6	5,2 \pm 1,2	1
Dosis Simple	300	12	14,7 \pm 2,2	13,4 \pm 2,7	8,6 \pm 2,2	7,2 \pm 2,2	4
	260	12	13,7 \pm 2,1	13,5 \pm 2,9	11,2 \pm 2,7	10,0 \pm 2,6	1
	200	12	10,7 \pm 2,1	11,2 \pm 4,2	6,8 \pm 1,6	4,7 \pm 1,2	2
	Valor P		0,2227	0,3393	0,3943	0,2593	0,2035

Las Tablas 3.16 y 3.17, muestran que el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación del FSH (Día 4) y el número de CL no fueron diferentes entre los grupos, pero hubo una tendencia ($P=0,07$) a favor de las vacas del grupo Control en el número de CL (Tabla 3.16). No se encontró un efecto de dosis de FSH significativa en el número de folículos 3-5 mm de diámetro en el Día 4, ni en el número de CL en el Día 17 ($P>0,2$).

Tabla 3.16. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis (mg)	N	Folículos 3-5 mm	CL
Control		36	19,3 \pm 1,2	16,2 \pm 1,4
Dosis Simple		36	18,4 \pm 1,1	13,0 \pm 1,2
Valor P			0,6008	0,0706
	300	24	18,2 \pm 1,7	16,4 \pm 1,7
	260	24	19,7 \pm 1,4	15,2 \pm 1,5
	200	24	18,7 \pm 1,2	12,2 \pm 1,6
Valor P			0,7693	0,1703

Tabla 3.17. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Brangus tratadas con 300, 260 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupo.

Grupos	Dosis (mg)	N	Folículos 3-5 mm	CL
Control	300	12	18,9 \pm 2,4	18,2 \pm 2,7
	260	12	19,5 \pm 2,3	16,7 \pm 2,1
	200	12	19,6 \pm 1,9	13,7 \pm 2,3
Dosis Simple	300	12	17,5 \pm 2,4	14,7 \pm 2,2
	260	12	19,9 \pm 1,7	13,7 \pm 2,1
	200	12	17,9 \pm 1,4	10,7 \pm 2,1
Valor P			0,9524	0,2640

EXPERIMENTO 4.3

Aunque el número total de CL fue mayor en el grupo Control que en el grupo Dosis Simple ($P<0,05$), el número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento ($P>0,05$; Tablas 3.18 y

3.19). Sólo una vaca en el grupo Control (recibió 200 mg de FSH) y dos vacas en el grupo Dosis Simple (una recibiendo 300 y la otra recibiendo 200 mg de FSH) tuvieron ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones. Además, sólo una vaca del grupo Control que recibió 300 mg de FSH y dos vacas del grupo Dosis Simple que recibieron 200 mg de FSH no produjeron ningún embrión transferible.

Tabla 3.18. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control		32	14,2 \pm 1,0 ^a	11,1 \pm 1,1	9,2 \pm 0,9	7,6 \pm 0,7	1
Dosis Simple		32	12,4 \pm 1,4 ^b	11,9 \pm 2,0	9,2 \pm 1,6	7,2 \pm 1,1	2
Valor P			0,0482	0,5261	0,3653	0,2881	0,5543
	300	32	13,7 \pm 1,2	11,9 \pm 1,9	9,6 \pm 1,6	7,6 \pm 1,0	1
	200	32	12,8 \pm 1,3	11,1 \pm 1,3	8,8 \pm 0,8	7,2 \pm 0,8	2
Valor P			0,3914	0,9674	0,8294	0,9294	0,5543

Tabla 3.19. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos de grupos.

Grupos	Dosis (mg)	N	CL	Ovocitos/embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	300	16	14,2 \pm 1,1	10,8 \pm 1,4	8,5 \pm 1,3	6,9 \pm 0,8	0
	200	16	14,1 \pm 1,7	11,4 \pm 1,6	9,8 \pm 1,2	8,2 \pm 1,1	1
Dosis Simple	300	16	13,3 \pm 2,1	13,1 \pm 3,5	10,7 \pm 3,0	8,2 \pm 2,0	1
	200	16	11,4 \pm 1,9	10,8 \pm 2,1	7,8 \pm 1,1	6,2 \pm 1,1	1
Valor P			0,475	0,9514	0,787	0,7392	0,8221

Las Tablas 3.20 y 3.21, muestran el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el día de la aplicación de FSH (Día 4) y el número de CL. Hubo diferencias significativas en el número de CL a favor del grupo Control ($P < 0,05$) mientras que no se encontraron diferencias entre los animales que fueron tratados con 200 o 300 mg de FSH.

Tabla 3.20. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis	N	Folículos 3-5 mm	CL
Control		32	18,8 \pm 1,3	14,2 \pm 1,0 ^a
Dosis Simple		32	17,9 \pm 1,1	12,4 \pm 1,4 ^b
Valor P			0,5806	0,0482
	300	32	18,1 \pm 1,2	13,7 \pm 1,2
	200	32	18,6 \pm 1,1	12,8 \pm 1,3
Valor P			0,6907	0,3914

Tabla 3.21. Número promedio (\pm EE) de folículos de 3 a 5 mm de diámetro cuando el tratamiento superovulatorio fue iniciado (Día 4) y número de CL en vacas Bonsmara tratadas con 300 y 200 mg de FSH administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o una dosis única diluida en 20 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. Efectos principales.

Grupos	Dosis	N	Folículos 3-5 mm	CL
Control	300	16	18,8 \pm 1,7	14,2 \pm 1,1
	200	16	18,9 \pm 1,9	14,1 \pm 1,7
Dosis Simple	300	16	17,4 \pm 1,8	13,3 \pm 2,1
	200	16	18,3 \pm 1,3	11,4 \pm 1,9
Valor P			0,9249	0,475

EXPERIMENTO 5

EXPERIMENTO 5.1

El número total de CL, número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento ($P > 0,05$; Tabla 3.22). Dos vacas en el grupo Control y cuatro vacas en el grupo Dosis Split no produjeron ningún embrión transferible. Sólo una vaca en el grupo Dosis Split tuvo ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones, mientras que no hubo vacas del grupo Control con menos de 2 CL en el día de la colecta de embriones. Además, 4 de 13 vacas en el grupo Control (31%) y 6 de 13 en el grupo Dosis Split (46,1%) no produjeron ningún embrión transferible ($P = 0,42$)

Tabla 3.22. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas *Bos Taurus* tratadas con 400 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ Embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	13	15,7 \pm 2,1	5,3 \pm 1,3	4,1 \pm 0,9	2,5 \pm 0,8	4
Dosis Split	13	15,4 \pm 1,9	9,8 \pm 2,8	5,2 \pm 2,2	3,7 \pm 1,3	6
Valor P		0,4941	0,2741	0,7902	0,7366	0,4200

EXPERIMENTO 5.2

Los resultados del Experimento 5.2 se resumen en la Tabla 3.23. No se encontraron diferencias entre los grupos en el número total de CL y en el número de ovocitos/embriones, pero el número de ovocitos fertilizados fue mayor ($P < 0,05$) y el número de embriones transferibles tuvo una tendencia a favor del grupo Control ($P = 0,06$). En este Experimento todas las vacas tuvieron más de 2 CL en el momento de la colecta de embriones, y solamente una vaca en cada uno de los grupos de tratamiento no produjeron embriones transferibles.

Tabla 3.23. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Brangus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" embriones transferibles
Control	14	19,7 \pm 1,4	23,3 \pm 3,5	19,4 \pm 3,6 ^a	13,5 \pm 3,2	1
Dosis Split	14	20,2 \pm 1,3	17,3 \pm 2,3	10,1 \pm 1,6 ^b	6,9 \pm 1,3	1
Valor P		0,6959	0,0554	0,0364	0,0623	1,000

EXPERIMENTO 5.3

Los resultados del Experimento 5.3 se encuentran en la Tabla 3.24. Aunque el número de CL y el total de ovocitos/embriones fue mayor en los grupos Dosis Split (10 mg/mL y 5 mg/mL AH) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de

tratamiento en el número de ovocitos fertilizados ni embriones transferibles. Dos vacas del grupo Control y una vaca en ambos grupos Dosis Split tuvieron ≤ 2 CL en el momento de la colecta de embriones ($P=0,8$). Además, 7 de 29 vacas (24,1%) en el grupo Control y Dosis Split 10 mg/mL AH no produjeron ningún embrión transferible, mientras que 4 de 29 vacas (13,8%) en el grupo Dosis Split 5 mg/mL AH no produjeron ningún embrión transferible ($P>0,05$).

Tabla 3.24. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas *Bos Taurus* tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V administrada en dosis decrecientes por vía i.m. cada 12 h durante 4 días o diluida en 10 mg/mL de AH o 5 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles
Control	29	12,0 \pm 1,3 ^a	10,2 \pm 1,8 ^a	6,7 \pm 1,3	4,0 \pm 0,8
Dosis Split 10 mg/mL AH	29	15,1 \pm 1,0 ^b	14,4 \pm 2,0 ^b	8,9 \pm 1,4	5,0 \pm 0,9
Dosis Split 5 mg/mL AH	29	15,3 \pm 1,1 ^b	14,3 \pm 2,1 ^b	9,3 \pm 1,9	6,1 \pm 1,3
Valor P		0,0071	0,0236	0,3222	0,2439

EXPERIMENTO 6

El número de CL, ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y embriones transferibles no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento ($P>0,05$; Tabla 3.25). Dos vacas en el grupo 1 (aplicación inmediata) tuvieron ≤ 2 CL en el momento de la colecta, mientras que todas las vacas de los grupos 2 (Congelado) y 3 (Refrigerado) tuvieron ≥ 2 CL en el día de la colecta de embriones. Además, 2 vacas en los grupos 1 y 2 no produjeron ningún embrión transferible, mientras que una vaca en el grupo 3 no produjo ningún embrión transferible.

Tabla 3.25. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas Angus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V diluida en 5 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h. La FSH fue reconstituida en el momento de su aplicación o fue reconstituida y congelada o refrigerada (3 a 5°C) por dos semanas antes de ser aplicada.

Grupos	N	CL	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles
1 (Aplicación inmediata)	20	16,2 \pm 2,5	16,1 \pm 2,7	10,9 \pm 2,3	7,4 \pm 1,5
2 (Congelado)	20	18,1 \pm 2,1	17,7 \pm 2,6	12,5 \pm 2,1	9,3 \pm 1,7
3 (Refrigerado)	20	17,2 \pm 1,6	16,0 \pm 2,0	12,4 \pm 2,0	8,5 \pm 1,4
Valor P		0,8179	0,8556	0,8334	0,6792

La Tabla 3.26 muestra el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro en el primer día de aplicación (Día 4), el número de folículos \geq 9 mm de diámetro en el Día 8, el número de CL y el número de ovocitos/embriones.

Tabla 3.26. Número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro (\pm EE) en el inicio del tratamiento superovulatorio (Día 4), número de folículos \geq 9 mm de diámetro en el Día 8, número de CL y número de ovocitos/embriones en vacas Angus tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V diluida en 5 mg/mL de AH y aplicada por vía i.m. cada 48 h. La FSH fue reconstituida en el momento de su aplicación o fue reconstituida y congelada o refrigerada (3 a 5°C) por dos semanas antes de ser aplicada.

Grupos	N	Folículos 3-5 mm	Folículos \geq 9 mm	CL	Ovocitos/ embriones
1 (Aplicación inmediata)	20	19,2 \pm 0,8	13,5 \pm 1,3	16,2 \pm 2,5	16,1 \pm 2,7
2 (Congelado)	20	19,4 \pm 1,3	14,8 \pm 1,3	17,2 \pm 1,6	16,0 \pm 2,0
3 (Refrigerado)	20	19,1 \pm 1,1	13,3 \pm 1,3	18,1 \pm 2,1	17,7 \pm 2,6
Valor P		0,9856	0,6935	0,8179	0,8556

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la hipótesis planteada; el tratamiento superestimulador con aplicaciones reducidas de FSH diluida en una formulación de liberación lenta a base de AH resultó en una respuesta superovulatoria similar a la de los tratamientos tradicionales con 8 aplicaciones de FSH en dosis decrecientes distribuidas en 4 días.

La decisión de utilizar al AH como vehículo de la FSH surgió a partir de los resultados obtenidos por trabajos previos donde fueron comparados distintos polímeros, como por ejemplo, plurónico, arginina, colágeno, propilenglicol y AH (Tríbulo et al., datos no publicados) y donde se concluyó que el AH era potencialmente un polímero que se podría utilizar para realizar un tratamiento superovulatorio. Varios polímeros han sido utilizados para tratamientos con FSH en vacas. Uno de los primeros estudios que se realizaron con un agente de liberación lenta fue con PVP. En un trabajo realizado por Yamamoto et al. (1994), la combinación de FSH con una solución de PVP al 30% y administrada en una sola aplicación por vía i.m.; resultó en una respuesta superovulatoria similar que el tratamiento tradicional de múltiples dosis durante 4 días. Estos resultados fueron similares a los que reportaron Satoh et al; (1996). Sin embargo, en un estudio posterior, Callejas et al. (2002) encontraron que la respuesta superovulatoria fue inferior a la del tratamiento con dosis múltiples. Además, en este mismo trabajo se utilizó la combinación de FSH con eCG, en donde obtuvieron una respuesta superovulatoria similar a la del tratamiento tradicional (Callejas et al., 2002).

El gel de hidróxido de aluminio es un adyuvante que puede absorber macromoléculas (como por ejemplo, proteínas), esto se debe a la fuerza electrostática que posee (Al-Shakhshir et al., 1994). En un estudio realizado por Kimura et al. (2007), demostraron que una sola aplicación de FSH en gel de hidróxido de aluminio es efectivo para inducir una respuesta superovulatoria en ganado bovino. Sin embargo, las

posibilidades de que sea aprobado para su uso son bastante remotas, puesto que es utilizado como adyuvante en vacunas tales como la de fiebre aftosa (Baylor et al., 2002). Por lo tanto es posible que si se utiliza para superovular vacas varias veces cada 35 días, como se hace en la actualidad (Bó y Mapletoft, 2014), podría producir una inmunización de esas donantes a la FSH. Por último, Choi et al. (2002) demostraron que al disolver FSH en propilenglicol (PEG), se obtiene una respuesta superovulatoria similar a la obtenida por un tratamiento de 8 aplicaciones de FSH durante 4 días. Si bien los resultados de estos trabajos en su mayoría fueron aceptables, el hecho de que hayan utilizado polímeros sintéticos o vehículos para vacunas, hace que estos compuestos dejen residuos en los tejidos. Por el contrario, el hecho de que el AH sea un polímero de origen natural y biocompatible, lo hace un candidato ideal para su uso como vehículo de la FSH.

El objetivo del primer experimento fue evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con una única inyección de FSH diluido en una solución a base de AH y administrada por dos vías. De esta manera se quería determinar cuál era la mejor vía de administración de la combinación del AH con FSH. Los resultados indicaron que administración de FSH diluida en AH en una sola aplicación por vía s.c. en la base de la oreja no fue eficaz, pero cuando la solución de FSH con AH se administró por vía i.m. la respuesta superovulatoria fue aceptable y no tuvo diferencias significativas con las vacas que recibieron inyecciones i.m. dos veces al día durante 4 días en una solución salina. Los resultados obtenidos en el grupo Control en este experimento fueron excepcionales, ya que se obtuvieron 10 embriones transferibles en promedio, cuando el promedio mundial es 6 aproximadamente (Perry, 2013; Bó y Mapletoft, 2014). Sin embargo, el método de mezclar la FSH con el AH era motivo de preocupación. La solución de 20 mg/ml de AH era muy viscosa, y se observó que luego de colocar el AH en el frasco de FSH era muy difícil lograr mezclarlo ya que se formaban grumos debido a la viscosidad del AH. Además, no fue posible extraer el total del contenido del frasco. Por lo tanto, se concluyó que la respuesta superovulatoria obtenida con una sola aplicación por vía i.m. fue numéricamente menor al tratamiento Control debido a que probablemente se haya administrado una menor cantidad de FSH. Esta conclusión se apoya en los perfiles de crecimiento de los folículos. Aunque el número de folículos (3-5 mm) que estaban presentes en el momento de iniciar tratamiento

superestimuladorio no difirieron entre los tratamientos, el número de folículos que alcanzaron los 9 mm de diámetro fue significativamente menor ($P=0,014$) en los grupos de una sola aplicación de FSH (s.c. o i.m.) que en el grupo Control.

Como consecuencia de lo observado en el primer experimento se decidió realizar un método efectivo y repetible para la preparación del AH con la FSH. Para ello lo que se hizo fue preparar la solución en una jeringa de 10 mL, en donde se diluyó la dosis a utilizar de FSH en 1 ml de solución salina (para evitar la formación de grumos) y luego se completó la jeringa con 9 ml de la solución de AH que estaba en una concentración de 22 mg/mL, para que luego de mezclarse con la FSH en solución salina tenga una concentración final de AH de 20 mg/mL. De esta manera asegurar que las vacas tratadas con AH tengan la dosis de FSH completa. Por lo tanto, el Experimento 2 se decidió evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con FSH diluida en dos concentraciones diferentes de AH (20 mg/mL o 10 mg/mL) y administrada en una única inyección i.m.

Al reducir la concentración de AH al 50 %, la solución resultante era mucho menos viscosa y más fácil de extraer del frasco. Sin embargo, la solución de AH de 10 mg/mL fue menos eficaz que la solución de 20 mg/mL para la inducción de superovulación. El perfil del diámetro folicular durante el período del tratamiento en el experimento 2 sugirió que la FSH diluida en 10 mg/mL de AH produjo una menor cantidad de embriones transferibles. Además, como se puede ver en la Figura 3.8 el crecimiento del folículo parecía disminuir después de 2 días (día 6) y en la Figura 3.11 se puede observar que las donantes tratadas con la solución de 10 mg/mL de AH tuvieron menor cantidad de folículos > 9 mm de diámetro que las vacas tratadas con la solución de 20 mg/mL de AH. Presumiblemente la razón de este menor desarrollo se debería a las inadecuadas concentraciones circulantes de FSH en la segunda mitad del protocolo de tratamiento, como se sugirió tras la administración s.c. de FSH en solución salina en vacas Holstein (Lovie et al., 1994). Podemos observar que los resultados obtenidos en el grupo de 20 mg/mL durante el experimento 2, ratifican los obtenidos en el experimento previo.

Los datos obtenidos en estos dos primeros experimentos, indicarían que para inducir superovulación en una vaca para carne con una sola aplicación de FSH combinada con AH, ésta debe ser administrada por vía i.m. en una solución de 20 mg/mL. Para poder confirmar estos resultados, se decidió realizar un nuevo experimento con el objetivo de evaluar la eficacia del tratamiento en un mayor número de animales. Para ello, se realizó el experimento 3 con el objetivo de evaluar la respuesta superovulatoria de vacas para carne tratadas con una única inyección de FSH diluida en 20 mg/mL de AH y administrada por vía i.m.

No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en ninguna de las variables analizadas entre los grupos, y el número de embriones transferibles fue alto, especialmente cuando se compara con los resultados obtenidos en donde se utilizó un protocolo de dos aplicaciones diarias durante 4 días (Hasler et al., 1983; Looney, 1986; Bó y Mapletoft, 2014). También es importante señalar que el número de folículos que responden a la FSH (3 a 5 mm de diámetro) en el momento de iniciar los tratamientos superestimuladores no difirieron significativamente entre los grupos, aunque numéricamente favoreció al grupo Control. Este punto es muy importante tenerlo en cuenta, ya que como se mencionó en la introducción, dependiendo del número de folículos antrales pequeños (de entre 3 a 5 mm de diámetro) que tenga cada vaca por onda folicular va a ser la respuesta superovulatoria (Monniaux et al., 1983; 2013; Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007). Además, el tratamiento con gonadotrofinas debe comenzar en el momento de la emergencia folicular para poder estimular la mayor cantidad de folículos antrales posibles y de esta manera obtener una mejor respuesta superovulatoria (Adams et al., 1994; Bó et al., 1995; Nasser et al., 1993).

Monniaux et al., (1983) identificó dos clases de vacas que tenían mala respuesta superovulatoria. El primer grupo tenía de 50 a 200 folículos en crecimiento ($\geq 0,7$ mm de diámetro) por ovario, en comparación con 600 o más folículos en los ovarios de las vacas que respondieron bien. La segunda clase de vacas con baja respuesta tenían un gran número de folículos, pero probablemente muchos de ellos estaban sufriendo atresia en el momento en que se iniciaron los tratamientos con gonadotrofina. Esta idea fué confirmada más tarde

por Burns et al. (2005); Ireland et al. (2007) y Mossa et al. (2010) que publicaron que el número de folículos por onda en bovinos es muy variable entre animales, pero altamente repetible dentro de los individuos. Además, se demostró que las vacas con números relativamente altos de folículos tuvieron concentraciones de inhibina-A más altos en suero, pero menor concentración de FSH en suero y las concentraciones de estradiol fueron similares durante la primera onda folicular en comparación con las vacas con un bajo número de folículos (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007). A su vez, Singh et al. (2004) han informado de diferencias en la respuesta superovulatoria entre vacas que tenían más de 30 folículos (3 a 5 mm de diámetro) en comparación con aquellas con menos de 30 folículos. Del mismo modo, Ireland et al. (2007) también realizó un estudio en donde informó que las vaquillonas de carne con un bajo número de folículos (≤ 15 folículos ≥ 3 mm de diámetro) en el momento de emergencia de la onda tenían menor respuesta superovulatoria que aquellos con alto número de folículos (≥ 25 folículos).

Otro punto que se desprende de esta idea, es la importancia que tiene realizar cada experimento con un diseño cross over, es decir, que todas las vacas pasen por todos los grupos de tratamiento para evitar la variación individual y de esta manera evitar que el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro presentes en cada onda folicular influya en los resultados afectando las posibles conclusiones.

Recientemente se ha reportado que el número de folículos fue asociado con las concentraciones circulantes de hormona antimülleriana (AMH; Ireland et al., 2011; Monniaux et al., 2013). AMH es una glicoproteína que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β que se produce por las células de la granulosa de los folículos en crecimiento y es más alta en pequeños folículos antrales sanos, que contribuyen más significativamente a los niveles de AMH endocrinos (Monniaux et al., 2013). En vacas y cabras adultas, los niveles de AMH fueron muy variables entre los individuos, pero estable en cada animal durante un período de varios meses (Monniaux et al., 2013). Por lo tanto, puede ser posible evaluar la reserva ovárica de folículos que responden a las gonadotropinas a través de la detección de la concentración circulante de AMH. Rico et al. (2012) han demostrado una correlación entre la producción de AMH y la respuesta

superovulatoria en donantes Holstein y han sugerido valores que podrían utilizarse para diferenciar entre las vacas que producen más o menos de 10 embriones transferibles. Estos datos son muy recientes y es necesaria más investigación en esta área para poder tener conclusiones más afianzadas.

Una vez que se confirmó que una única aplicación de FSH diluida en 20 mg/mL de AH resulta en una respuesta superovulatoria similar a la de un tratamiento de dos aplicaciones diarias durante cuatro días, se decidió realizar una serie de experimentos para determinar cuál era la dosis adecuada para diferentes razas para carne. Es por eso que el Experimento 4 tuvo como objetivo evaluar la respuesta superovulatoria de donantes Angus, Brangus y Bonsmara tratadas con distintas dosis de FSH diluida en AH y administrada en una única inyección por vía i.m.

Si hacemos un análisis de los resultados obtenidos en cada una de las razas podemos decir que no hubo diferencias en el número de embriones transferibles en las donantes Bonsmara que recibieron 200 o 300 mg de FSH. Sobre la base de datos de ovocitos/embriones de ambos parece ser igualmente eficaz. En las donantes Angus los datos parecen sugerir que la dosis de 300 mg es óptima, basada en el número de embriones transferibles. No hubo diferencias en la producción de embriones en donantes Brangus que recibieron 200, 260 o 300 mg de FSH; basado en el número de embriones transferibles pero las diferencias numéricas parecen sugerir que la dosis de 260 mg es óptima.

Si bien los resultados obtenidos confirman que una sola inyección de FSH diluida en una solución de 20 mg/mL de AH es altamente eficaz en la superestimulación de donantes Angus, Brangus y Bonsmara; encontramos diferencias significativas en el número de CL en todos los experimentos a favor de los animales del grupo Control. Es importante tener en cuenta que la respuesta superovulatoria fue confirmada al contar la cantidad de CL presentes en los ovarios mediante palpación transrectal, quizás esa sea la explicación de la diferencia encontrada ya que esa diferencia no se vio reflejada en la cantidad de estructuras (ovocitos/embriones) colectados ni en la cantidad de embriones transferibles obtenidos. Esto puede deberse a errores en la palpación, ya que cuando una donante con una buena

respuesta superovulatoria (por ejemplo más de 10 CL por ovario) es palpada, es muy difícil confirmar exactamente el número real de CL. Lo que generalmente se hace es decir una cantidad aproximada para luego de realizar la colecta de embriones corroborar con la cantidad de estructuras (ovocitos/embriones) encontrados en el laboratorio. Por otro lado, intentar contar los CL mediante ultrasonografía también es engorroso cuando la donante tiene una gran cantidad de CL ya que no se puede determinar cuándo empieza y termina un CL (Robertson et al., 1993).

Todos los experimentos anteriores (1, 2 y 3) se habían llevado a cabo con donantes de embriones de la raza Angus y con una dosis de 400 mg de FSH (Folltropin-V). Se decidió utilizar consistentemente estas variables (raza de las donantes y dosis de FSH) para evitar sumar factores que podrían interferir en los resultados y de esta manera poder tomar decisiones más acertadas. Se utilizó dicha dosis ya que en resultados anteriores reportados por Bó et al. (1994) y publicaciones previas (González et al. 1990) se reportó que 400 mg de FSH era la dosis apropiada en donantes de embriones en razas para carne. Sin embargo, la experiencia más reciente sugiere que una dosis de 300 mg de FSH puede ser más apropiada para la superestimulación de donantes Angus con inyecciones dos veces al día. Una de las razones de la discrepancia entre los estudios anteriores y el enfoque más reciente a la superovulación (que fue utilizado en el presente experimento) puede ser que en los estudios anteriores las vacas eran superestimuladas en los días 8 a 12 del ciclo estral, independientemente de la etapa de la onda folicular en el momento de iniciado el tratamiento, mientras que en el presente estudio, las vacas se superestimularon cerca del momento de la aparición de la onda folicular (es decir, 4 días después del tratamiento con estradiol y progesterona). Por lo tanto, una dosis menor de FSH puede ser más apropiada para la superestimulación de una cohorte de folículos sincronizados que de una cohorte de folículos no sincronizados. Basándose en los resultados del presente estudio, la dosis de 300 mg parece ser la dosis óptima de FSH para donantes de embriones Angus, independientemente de si se administra como una sola inyección i.m. en AH o con múltiples inyecciones i.m. en solución salina. Además, una dosis de 200 mg es menos eficaz como tratamiento superestimulador tanto en una sola inyección o con múltiples

inyecciones, como también se ha mostrado anteriormente (Bó et al., 1994; González et al., 1990).

Además de la dosis de FSH, otro factor importante a considerar en los programas de superestimulación es la pureza de la preparación de gonadotropina. Extractos de pituitaria purificada con baja contaminación de LH han resultado en mayor cantidad de embriones transferibles, sin los efectos adversos asociados con altas dosis de LH en la calidad embrionaria (Mapletoft et al., 2002). Aunque se cree generalmente que se requiere algo de LH para inducir una superovulación exitosa, los niveles de LH endógenos pueden ser adecuados. Chupin et al. (1984) realizó un estudio en donde superestimuló tres grupos de vacas lecheras con cantidades variables de LH, y mostraron que la tasa de ovulación media y el número de embriones recuperados y transferibles aumentaban a medida que la dosis de LH disminuía. Lo mismo fue reportado por Willmot et al. (1990) en vacas para carne y por Tríbulo et al. (1991) en Brahman. Se ha sugerido que la calidad del embrión puede verse influida negativamente por los altos niveles de LH durante la superestimulación debido a la activación prematura del ovocito (Moor et al., 1984). Donaldson y Ward (1985) informaron de que la eliminación de la LH de un extracto de pituitaria (FSH-P, Schering Plough, USA) aumentó la respuesta superovulatoria de vacas donantes que a su vez requirieron menores dosis de FSH purificada para obtener la respuesta máxima. Murphy et al. (1984) estudiaron diferentes proporciones de FSH/LH, donde compararon la FSH-P con FSH-P más pLH (relación 5:1 o mayor) y se encontró que cuando la relación de FSH/LH era mayor que 5:1, hubo una reducción significativa en el número de CL y una tendencia a una menor tasa de fertilización. Monniaux et al. (1983) informaron de resultados similares utilizando FSH-P y pLH en una relación 5:1. Colectivamente, estos datos sugieren que el aumento de cantidades de LH en las preparaciones de gonadotrofinas usadas para inducir superestimulación inhiben la respuesta folicular y la calidad del ovocito (Mapletoft et al., 2002).

Aunque altas dosis de extractos de pituitaria podrían resultar en niveles elevados de LH en circulación, se ha reportado que el Folltropin-V tiene reducidas concentraciones de LH (aproximadamente el 84% de LH eliminado). Por otra parte, dos inyecciones diarias de

extractos de pituitaria con altas concentraciones de LH (Tríbulo et al., 1991) y el incremento de las dosis de gonadotrofinas con altas concentraciones de LH también resultó en una reducción de la calidad de los embriones y más folículos anovulatorios (Murphy et al., 1984; Pawlyshyn et al., 1986; Mapletoft et al., 1991; Bó et al., 1994).

Las altas tasas de fertilización y tasas de embriones transferibles en ausencia de LH exógena tienden a sugerir que la administración de LH, en cualquier dosis, puede ser perjudicial para la calidad del embrión (Mapletoft et al., 2002). En el trabajo de Willmott et al. (1990) informaron que la LH dentro de las preparaciones de FSH afecta a la respuesta superovulatoria y que el nivel máximo aceptable de LH parece estar entre 15 y 20%. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Mapletoft et al. (1988) y González et al. (1990). Además, las preparaciones con alto contenido de LH administrado en una sola inyección resultó en una cantidad inferior de embriones transferibles que las preparaciones con un contenido reducido de LH (Mapletoft et al., 1992). Por su parte, las dosis de FSH de 600 y 800 mg administrados en una sola inyección s.c. tendieron a resultar en tasas de fertilización más bajas y pobre calidad embrionaria en comparación con los de las vacas tratadas con 400 mg (Bó et al., 1994). Además, la dosis de 800 mg de FSH mediante una única inyección resultó en una mayor cantidad de folículos anovulatorios y elevados niveles de progesterona al estro. Esto podría deberse de que una sola inyección podría dar lugar a una sobredosificación con LH.

En comparación con razas *Bos taurus*, las razas de ganado *Bos indicus* tienen varias diferencias en la fisiología reproductiva. Se ha reportado de que las razas *Bos indicus* tienen un mayor número de folículos dentro de cada onda folicular (Carvalho et al., 2008) y un mayor número de ovocitos se han recuperado después de la aspiración folicular (3 a 4 veces mayor; Martins et al., 2007). El número medio de ovocitos recuperados por procedimiento de aspiración folicular es 18-25 ovocitos en razas *Bos indicus* (Pontes et al., 2011; Thibier 2004; Watanabe, 1999) y 4-14 ovocitos en las razas *Bos taurus* (Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins et al., 2007). También se ha demostrado que las razas *Bos indicus* tienen una mayor sensibilidad a las gonadotrofinas exógenas que las *Bos taurus* (Baruselli et al., 2006). Por lo tanto, las dosis de FSH para la superestimulación son

normalmente más bajas para razas *Bos indicus* que para razas *Bos taurus*. Esta idea parece haber sido apoyada por los resultados de los experimentos 4.1 y 4.2; la dosis óptima de FSH fue mayor en vacas Angus (Experimento 4.1) que en Brangus (Experimento 4.2).

Uno de los beneficios de utilizar una única inyección de FSH en AH es reducir el estrés en las donantes debido a la reducción del número de inyecciones. Se ha reportado que el estrés ocasionado por el manejo reduce la capacidad de respuesta de la glándula pituitaria a la GnRH para estimular la liberación de LH necesarios para el desarrollo del folículo y la ovulación en diferentes especies (Ciechanowska et al., 2010; Maeda et al., 2010; Kinsey-Jones et al., 2009). Además, en un estudio previo se reportó que el estrés disminuye el número de CL y aumenta los niveles de cortisol en vaquillonas superovuladas (Edwards et al., 1987). En un estudio que involucró vacas *Bos indicus* (Bó et al., 1991), una sola inyección s.c. de FSH dio lugar a una respuesta superovulatoria significativamente mayor que la de un tratamiento con dos inyecciones diarias durante cuatro días. Esa diferencia podría estar asociada al estrés provocado de dos tratamientos al día. Sin embargo, en este estudio no se encontraron los mismos resultados en las donantes Brangus utilizados en el Experimento 4.2. No obstante, los resultados de este estudio pueden ser interpretados para sugerir que una sola inyección de una dosis ajustada de FSH es adecuado para programas de superestimulación en el ganado bovino.

La idea de reducir las aplicaciones de FSH para evitar el estrés y mejorar la respuesta superovulatoria se ha utilizado en otras especies, como por ejemplo, en Bisontes (*Bison bison athabasca*; Toosi et al., 2013). Los resultados de los experimentos sugirieron que la frecuencia del tratamiento se relaciona inversamente con la respuesta superovulatoria en bisontes. Una sola aplicación de 400 mg de FSH en 10 mg/mL de AH fue tan eficaz como dos dosis de FSH en solución salina (200 mg cada una, con dos días de diferencia), pero la FSH en AH estimuló el crecimiento folicular alcanzando un mayor diámetro y acortando el intervalo desde el inicio del tratamiento a la ovulación (Experimento 1; Toosi et al., 2013). En el segundo experimento de este trabajo, sólo se realizó ecografía durante el tratamiento superestimulador, en donde se obtuvo una gran cantidad de folículos con ≥ 9

mm de diámetro en bisontes tratados con la misma dosis total de FSH en 2 vs 4 tratamientos (Experimento 2; Toosi et al., 2013).

A pesar de que todos estos resultados permiten pensar de que una sola aplicación de FSH diluida en 20 mg/mL de AH resulta en una satisfactoria respuesta superovulatoria; la dilución de la FSH con el AH requiere demasiado trabajo y cuidado para que toda la droga se disuelva correctamente y de esta manera obtener una buena respuesta superovulatoria y evitar lo sucedido en el primer experimento de esta tesis. Además de reducir el estrés en las donantes, la reducción en el número de aplicaciones de gonadotrofinas permite una mayor difusión de la técnica debido a la simplicidad en el tratamiento. Por lo tanto, si el método de dilución no es seguro, los resultados no serían consistentes, especialmente si no es aplicado por profesionales.

Como se aclaró al principio de este capítulo, se tuvo que modificar el método de dilución debido a que la viscosidad de la solución de 20 mg/mL de AH impedía recuperar el total del volumen del frasco de FSH. Con motivo de intentar facilitar la dilución se decidió reducir la concentración del AH al 50%, es decir, una concentración de 10 mg/mL. Esta concentración resultó menos viscosa y más fácil de preparar, pero como vimos en el Experimento 2, una única inyección i.m. resultó en una menor cantidad de embriones transferibles, presumiblemente por un efecto de menor cantidad de FSH circulante. Si observamos la Figura 3.8 (Experimento 2) en donde se analiza el tamaño folicular promedio cuando comparamos una sola aplicación i.m. de FSH diluida en dos concentraciones de AH (10 mg/mL vs 20 mg/mL) no hubo diferencias entre los grupos en los primeros dos días de tratamiento, pero para el momento del estro (3 días más tarde) varios folículos en el grupo de menor concentración de AH no llegaron a un tamaño ovulatorio (≥ 9 mm de diámetro). Una observación similar fue reportada después de la administración de una única inyección s.c. de FSH en solución salina en vacas Holstein (Lovie et al., 1994) y después de una única inyección i.m. de Folltropin en solución salina en vacas para carne (Bó et al., 1991). Especulamos que una inyección adicional de Folltropin-V diluida en 10 mg/mL de AH 48 horas después de iniciado el tratamiento superovulatorio causaría un crecimiento folicular continuo hasta alcanzar un tamaño

ovulatorio como ocurrió en el grupo de AH con una concentración de 20 mg/mL. Se decidió evaluar de esta manera un tratamiento similar al desarrollado por Lovie et al. (1994) en donde la dosis total de FSH es dividida en dos aplicaciones con 48 horas de diferencia. Además, la división de la dosis en dos inyecciones fue diseñada para que se aplicara cuando el animal tenía que ser manejado por otros tratamientos, por ejemplo, la administración de la prostaglandina. De este modo, la superestimulación fue inducida sin manipulación adicional de los animales sobre el protocolo de una sola inyección, lo que debería reducir la probabilidad de un estrés del animal asociado con el manejo.

Las concentraciones de FSH en sangre después de la inyección dependerán de la absorción desde el lugar de la administración y el metabolismo de la hormona. Si nos basamos en la tasa de metabolismo (Demoustier et al., 1988), esperaríamos que la FSH se elimine del torrente sanguíneo a la misma velocidad, independientemente de su concentración. Una rápida absorción de los extractos de pituitaria debería dar lugar a una rápida eliminación de la FSH. Por lo tanto, folículos expuestos a altas concentraciones de FSH durante un intervalo muy corto parece ser incapaz de sostener el crecimiento de los folículos hasta la ovulación. Resultados preliminares de un estudio publicado previamente (Bó et al., 1994) indicaron que después de una sola administración i.m. de Folltropin-V en solución salina (o inyección s.c. en animales magros), las concentraciones de FSH en sangre fueron más altas, y posteriormente disminuyeron más rápidamente que en las vacas con una condición corporal alta que recibieron una única inyección s.c., presumiblemente a causa de la absorción más lenta en las vacas con alta condición corporal. También se ha demostrado que la adición de la FSH a una solución de polivinilpirrolidona (Takedomi et al., 2005), gel de hidróxido de aluminio (Kimura et al., 2007) o polyethyleneglycol (Choi et al., 2002), dió lugar concentraciones sanguíneas elevadas y a una absorción más lenta y más prolongadas, que cuando la FSH fue administrada con solución salina como vehículo. Teniendo en cuenta nuestros resultados, la mezcla de Folltropin-V con una solución de AH también redujo la tasa de absorción, resultando en concentraciones sostenidas de FSH en sangre. Por lo tanto, parece ser que las características del vehículo influyen en la tasa de absorción de FSH, lo que sería un factor limitante en la inducción de la superovulación con una sola administración de Folltropin-V.

Los resultados de los Experimentos 5.1 y 5.2 demuestran lo planteado anteriormente, en donde al dividir las dosis de FSH en dos aplicaciones con 48 horas de diferencia se indujo una buena respuesta superovulatoria. En el caso del primer experimento, los datos parecen ser más parejos entre ambos grupos de tratamiento ya que no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas ($P \geq 0,2$), mientras que en el experimento siguiente hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de ovocitos fertilizados ($P < 0,05$). A su vez, en el número ovocitos/embriones y el número de embriones transferibles tuvieron una tendencia a favor del grupo Control ($P = 0,055$ y $P = 0,062$ respectivamente). Al igual que en el Experimento 1, los resultados obtenidos en el grupo Control fueron excepcionales, ya que se obtuvieron 13 embriones transferibles cuando el promedio mundial de esta variable es 6 aproximadamente (Perry, 2013), mientras que los embriones transferibles en el grupo Dosis Split fue igual o quizás superior a la media. Si tenemos en cuenta los datos obtenidos en el trabajo realizado por Lovie et al. (1994), podemos ver que una única inyección s.c. de Folltropin diluida en solución salina no es tan eficaz como las inyecciones múltiples en la inducción de superovulación en vacas Holstein. Sin embargo, cuando la dosis fue dividida en dos inyecciones s.c. con 48 horas de diferencia la respuesta superovulatoria aumentó. Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en los Experimentos 5.1 y 5.2 se realizó un nuevo trabajo (Experimento 5.3), en donde se comparó un protocolo tradicional de dos inyecciones i.m. diarias durante 4 días con un protocolo de dos inyecciones i.m. de FSH diluidas en AH (en dos concentraciones, 10 mg/mL o 5 mg/mL). Aunque los resultados obtenidos con dos inyecciones de FSH diluidos en 10 mg/mL de AH era tan eficaz como con una sola inyección de AH más concentrada (20 mg/mL). Una concentración de AH más baja asegura una dilución segura y confiable con la FSH.

Al observar los resultados de este último experimento, es importante notar que 7 de 29 vacas (24,1%) en los grupos Control y Split 10 mg/mL de AH no produjeron embriones transferibles, mientras que sólo 4 de 29 vacas (13,8%) del grupo Split 5 mg/mL de AH no produjeron embriones transferibles. Aunque no es significativo, este resultado junto con los resultados en donantes Brangus (Experimento 5.2) en la cual dos inyecciones de FSH en 10 mg/mL de AH eran menos eficaz que el protocolo de tratamiento dos veces al día, sugiere

que la solución de AH de 10 mg/mL podría no ser tan eficaz como la solución de AH de 5 mg/mL en la inducción de superestimulación con dos inyecciones i.m. de Folltropin-V. Otra posibilidad es que la FSH no se mezcle correctamente con la solución de 10 mg/mL de AH, lo que podría explicar las respuestas superovulatorias menos consistentes en los animales tratados con esta preparación.

Por otro lado, no hubo diferencias en los perfiles de crecimiento folicular, lo que sugiere que la aplicación de dos inyecciones i.m. de Folltropin-V, ya sea en una solución de 10 mg/mL o 5 mg/mL de AH proporcionó suficiente FSH para estimular el crecimiento de los folículos hasta alcanzar un tamaño ovulatorio. Aunque la dosis óptima de Folltropin-V para ser administrado con dos inyecciones i.m. no se determinó, parece ser similar a la que se administra por medio de inyecciones dos veces al día, como se ha demostrado previamente con una sola inyección i.m. de Folltropin-V en una solución de 20 mg/mL de AH (Experimentos 4.1, 4.2 y 4.3).

Hasler y Hockley (2012) reportaron los datos de un estudio realizado con donantes *Bos taurus* utilizando FSH diluida en 5 mg/mL de AH, en donde los autores compararon un protocolo tradicional (Grupo Control, n=109) de ocho inyecciones con dosis decrecientes (260 a 400 mg) dos veces al día con un protocolo de dos inyecciones i.m. de FSH en 5 mg/mL de AH con 48 horas de diferencia, en donde al igual que en esta tesis el 67 % de la cantidad total de FSH se aplicó en el primer día y el 33 % restante dos días después (n=103). En este trabajo las donantes fueron inseminadas 12 y 24 horas después del estro. Estos investigadores no encontraron diferencias entre el grupo Control y el grupo superestimulando con dos inyecciones de FSH diluida en AH, para el número de ovocitos/embriones ($14,0 \pm 1,0$ vs $12,2 \pm 1,0$), embriones transferibles ($7,9 \pm 0,8$ vs $6,8 \pm 0,8$), embriones degenerados ($2,7 \pm 0,4$ vs $2,4 \pm 0,4$) y ovocitos no fertilizados ($3,4 \pm 0,5$ vs $3,1 \pm 0,5$), respectivamente.

Hasta aquí hemos visto que es posible utilizar una o dos aplicaciones de FSH diluidos en AH para inducir una superovulación en vacas de razas para carnes donantes de embriones. Una pregunta posible a estos trabajos podría ser, como se podría almacenar la

preparación para su posterior uso. Para esto se decidió realizar el experimento 6 con el objetivo de evaluar la respuesta superovulatoria en vacas donantes de embriones Angus tratadas con FSH diluida en 5 mg/mL AH y administrado en dos aplicaciones i.m. cada 48 horas, luego de haber sido refrigerada o congelada por dos semanas. En la literatura no existe un trabajo en el cual se haya evaluado si la FSH una vez preparada con solución salina y almacenada (refrigerada ó congelada) por un cierto período de tiempo tiene el mismo efecto que cuando se la utiliza inmediatamente después de diluirla. A pesar de esto, muchos veterinarios con una vasta experiencia congelan la FSH restante luego de un tratamiento superestimulador y la utilizan en otro trabajo sin problemas, presuponiendo que no hay disminución de la actividad biológica de la FSH luego de la congelación y descongelación.

No hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las variables analizadas. Los resultados confirman que, tras la reconstitución de la FSH en 5 mg/mL de AH esta se puede congelar o refrigerar durante un período de 2 semanas sin afectar negativamente la respuesta superovulatoria.

CONCLUSIONES

La superestimulación de vacas donantes Angus con una sola inyección i.m. de FSH diluida en 20 mg/mL de AH resultó en un número de embriones transferibles similar al de un protocolo tradicional de dos inyecciones i.m. diarias de FSH diluidas en solución salina durante cuatro días.

La dosis óptima de FSH en un protocolo de una sola aplicación por vía i.m. en una solución de 20 mg/mL de HA requerida para inducir superovulación en vacas donantes de embriones es de 300 mg para las de la raza Angus, 260 mg para las Brangus, y 200 mg para las Bonsmara.

La superestimulación con dos aplicaciones de FSH diluida en una solución de 5 mg/mL de AH resultó en un número de embriones transferibles similar a la de un tratamiento tradicional de FSH diluida en solución fisiológica y administrada i.m. dos veces al día durante cuatro días.

La preparación de FSH con AH puede ser almacenada (refrigerada o congelada) durante un período de 2 semanas sin afectar la respuesta superovulatoria de las donantes luego de su aplicación.

La ventaja de este nuevo tratamiento es la reducción en el manejo de las donantes y potencialmente la disminución del estrés especialmente en individuos menos manejables.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams G.P., Matteri R.L., Kastelic J.P., Ko J.C., Ginther O.J. 1992. Association Between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular wave in heifers. *J Reprod Fertil*, 94:177-188.
- Adams G.P., Nasser L.F., Bó G.A., Garcia A., Del Campo M.R., Mapletoft R.J. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*, 42:1103-1113.
- Adams G.P. 1998. Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. In: Proceedings of the XX congress of the world association for buiatrics, 2:595–605.
- Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69: 2-80.
- Alkemade S.J., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1993. Superovulation in the cow; Effects of biological activity of gonadotropins. In: Proc Ann Mtg Am Embryo Assoc Portland, Maine.
- Al-Shakhshir R.H., Regnier F.E., Whiate J.L., Hem S.L. 1994. Effect of protein adsorption on the surface characteristics of aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 12:472–4.
- Bae Y.H., Okano T., Kim S.W. 1991. "On-off" thermocontrol of solute transport. II. Solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharm Res*, 8:624-8.
- Baker, R.W. 1987. en "Controlled Release of Biologically Active Agents", Wiley & Sons, Nueva York, pp. 120-121.
- Ball G.D., Bellin M.E., Ax R.L., First N.L. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol Cell Endocrinol*, 28:113-122.
- 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.

- Baylor N.W., Egan W., Richman P. 2002. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine* 20:18–23.
- Bellows R.A., Anderson D.C., Short R.E. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone *J Anim Sci* 28:638-644.
- 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. *An Reprod Sci*, 49:1-12.
- 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., Hockley D.K., Nasser L.F., Mapletoft R.J. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology*, 42:963-975.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995. Exogenous control of follicular development 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 β 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. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57:53-72.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Martinez M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 78:307–26.
- 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., 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.
- Bó GA, Mapletoft RJ. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81:38–48.
- Braden TD, Gamboni F, and Niswender GD. 1988. Effects of prostaglandin F-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 39:245.
- Brogliatti G., Bó G.A., Alisio L., Martinez M., Palasz A., Mapletoft R.J. 1996. Efecto de la dosis y la via de administracion de folltropin en la superestimulacion de vacas Holstein. II Simposio internacional de reproducción animal. 31 Oct – 2 Nov. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, pp.45-48.
- 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.
- Burns D.S., Jimenez-Krassel F. J., Ireland J.L.H., 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 folliclestimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62.
- Butler W.R., Katz L.S., Arrióla J., Milvae R.A., Foote R.H. 1983. On the negative feedback regulation of gonadotropins in castrate and intact cattle with comparison of two FSH radioimmunoassays. *J. Anim. Sci.*, 56:919-929.
- Callejas S.S., Alberio R., Cabodevila J.A., Dulout F., Aller J., Teruel M. 2002. Ovarian stimulation with FSH-P in single dose in polivinylpirrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 22:141-151.
- Carvalho J.B.P., Carvalho N.A.T., Reis E.L., Nichi M., Souza A.H., Baruselli P.S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69:167–75.
- Choi S.H., Park Y.S., Cho S.R., Kang T.Y., Sin S. H., Kang S.S., Rho G.J., Choe S.Y. 2002. Superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a

- single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol. Korean J. Emb. Trans., 17:67-77.
- 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).
- Chupin D., Combarous Y., Procureur R. 1985. Different effect of LH on FSH induced superovulation in two breeds of cattle Theriogenology, 23:184 (abstract).
- Church R.B., Shea B.F. 1977. The role of embryo transfer in cattle improvement programs. Can. J. Anim. Sci. 57:33-45.
- Ciechanowska M., Lapot M., Mateusiak K., Przekop F. 2010. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. Reproductive biology, 10: 85-124.
- Critser J.K., Rowe R.F., Del Campo M.R., Ginther O.J. 1980. Embryo transfer in cattle: Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos, and length of post-treatment estrous cycles. Theriogenology, 13:397 (abstract).
- DeAngelis P.L., Weigel P.H. 1995. Characterization of the recombinant hyaluronic acid synthase from Streptococcus pyogenes. In: Ferretti JJ, Gilmore MS, Klaenhammer TR, Brown F. Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci. Dev. Biol. Stand. No. 85. Basel: Karger, 225–9 pp.
- Demoustier J.M., Beckers J.F., Van Der Zwalmen P., Closset J., Gillard J., Ectors F.R. 1988. Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. Theriogenology 30:379-386.
- 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).
- Donaldson L.E., Hansel W. 1968. Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow. Australian Vet J, 44: 304-308.
- Donaldson L. 1984. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. Theriogenology, 22:97-99.

- Donaldson L and D Ward. 1985. Superovulation in cattle: Dose-response to FSH-p with and without LH contamination *Theriogenology*, 23:189 (abstract).
- Dumitriu S., Dumitriu-Medvichi C. 1994. Hydrogel and general properties of biomaterials, Chapter 1 in “*Polymeric Biomaterials*”, ed. Dumitriu S., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp.3.
- Edwards L.M., Rahe C.H., Griffin J.L., Wolfe D.F., Marple D.N., Cummins K.A. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology*, 28:291–9.
-
- Eliaz RE, Szoka FC. 2001. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *Cancer Res*, 61: 2592–2601.
- Evans A.C.O., Adams G.P., Rawlings N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age, *J. Reprod. Fertil*, 102:463–470.
- Evans A.C. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim*, 38:240–246.
- Evans A.C.O., Mossa F., Fair T., Lonergan P., Butler S.T., Zielak-Steciwo A.E., Smith G.W., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L.H., Ireland J.J. 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl*, 67:421–429.
- Fassihi R.A., Ritschel W.A. 1993. Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: in vitro and in vivo evaluation. *J. Pharm. Sci.*, 82, 750.
- Findlay J.K., Robertson B.M., Clarke I.J., Klein R., Doughthon B.W., Xiao S., Russell D.L., Shukovski L. 1992. Hormonal regulation of reproduction-general concepts. *Anim Reprod Sci*, 28:319-328.
- Fraser J.R.E., Laurent T.C. 1989. Turnover and metabolism of hyaluronan. In *The Biology of Hyaluronan*, Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester, England, 143:41-59.
- Fraser J.R.E., Laurent T.C. 1996. Hyaluronan. In: Comper WD, ed. *Extracellular Matrix, 2. Molecular Components and Interactions*. Amsterdam: Harwood Academic Publications, pp. 141–99.
- Fraser J.R., Laurent T.C., Laurent U.B. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, 242:27–33.
-

- Furnus C.C., de Matos D.G., Martinez A.G. 1998. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 49:1489-1499.
- Gehrke S.H., Cussler E.L. 1989. Mass transfer in pH-sensitive hydrogels. *Chem. Eng. Sci.*, 44, 559.
- Ginther O.J., Kastelic J.P., Knopf L. 1989. 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., 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. 2000. 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., Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K. 2001. Follicle selection in monovular Species. *Biol Reprod*, 65:638-647.
- Glennay A.T., Pope C.G., Waddington H., Wallace U. 1926. XXIII—the antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*, 29:38–9.
- Gonzalez A., Lussier J.G., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, 33:519-519.
- González 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.
- González A., Wang H., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1994b. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J*, 35: 158-162.
- Graham N.B. 1990. *Chemistry and Industry*, 15:482-6.
- Griffith L.G. 2000. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 48:263-277.
- Gupta R.K., Rost B.E., Relyveld E., Siber G.R. 1995. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. In: Powell MF, Newman MJ editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press, pp. 229–48.

- Hahn J. 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, 38: 269-275.
- Hasler J.F., McCauley A.D., Schermerhorn E.C., Foote R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
- Hasler J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 75:2857-2879.
- Hasler J.F., Hockley D. 2012. Efficacy of hyaluronan as a diluent for a two injection FSH superovulation protocol in *Bos taurus* beef cows. *Reprod Domest Anim*, 47:459 (abstract).
- Hockley D.K., Bó G.A., Palasz A.T., Del Campo M.R., Mapletoft R.J. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology*, 37:224 (abstract).
- InfoStat. 2008. InfoStat/Profesional, versión 2008p. Grupo InfoStat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Ireland J.J., Roche J.F. 1983. Development of monovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropin. *Endocrinol*, 112:150-156.
- Ireland J.J. 1987. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34:39-54.
- Ireland J.J., Roche J.F. 1987. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle, in: Roche J.F., O'Callaghan D., *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 1–18.
- Ireland J.J., Ward F., Jimenez-Krassel F., Ireland J.L.H., Smith G.W., Lonergan P., Evans, A.C.O. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod*, 22:1687–1695.
- Ireland J.L.H., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P.N., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C.O., Ireland, J.J. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod*, 79:1219–1225.

- Ireland J. J., Smith G.W., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L.H., Mossa F., Lonergan P., Evans A.C.O. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 23:1–14.
- Jimenez-Krassel F., Folger J., Ireland J.L.H., Smith G.W., Hou X., Davis J.S., Lonergan P., Evans A.C.O., Ireland J.J. 2009. Evidence tAHt high variation in ovarian reserves of healthy young adults AHs a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281.
- Jinhua Yuan. 2007. Several Factors to consider when selecting a pharmaceutical excipient, Eastman Chemical Company, October, USA.
- Kelly P., Duffy P., Baguisi A., Dobrinsky J.R., Overstrom E.W., Duby R.T., Roche J.F., Boland M.P. 1995. Effect of FSH type and number of injections on peripheral FSH concentrations, follicle numbers and embryo yield in heifers. *Theriogenology*, 43:245.
- Kimura K., Hirako M., Iwata H., Auki M., Kawaguchi M., Seki M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, 68:633-639.
- Kinsey-Jones J.S., Li X.F., Knox A.M., Wilkinson E.S., Zhu X.L., Chaudhary A.A., Milligan S.R., Lightman S.L., O'Byrne K.T. 2009. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21:20-29.
- 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.
- Kou J.H., Amidon G.L., Lee P.I. 1988. pH-Dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly-(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogels. *Pharmaceutical Research*, 5:592-597.

- Lane M., Maybach J.M., Hooper K., Hasler J.F., Gardner D.K. 2003. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol Reprod Dev*, 64:70-78.
- Langer R., Cima L.G., Tamado J.A., Witermantel E. 1990. Future directions in biomaterials. *Biomaterials*, 11:738-45.
- Laster D.B., 1972. Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 30:407-415.
- Laurent U.B.G., Laurent T.C. 1981. On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem.* 2:195-199.
- Laurent T.C., Fraser J.R.E. 1986. The properties and turnover of hyaluronan. In *Functions of Proteoglycans*, Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester, England 124:9-29.
- Laurent T.C., Fraser J.R.E. 1991. Catabolism of hyaluronan. In *Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology*. Henriksen J.H. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 249-265.
- Lerner S.P., Thayne W.V., Baker R.D., Hensche T., Meredith S., Inskip E.K., Dailey R.A., Lewis P.E., Butcher R.L. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows, *J. Anim. Sci.* 63:176-183.
- Lindsell C.E., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1986. Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 26:209-219.
- Looney C.R., Boutle B.W., Archibald L.F., Godke R.A. 1981. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation, 0 beef cattle. *Theriogenology*, 15:13-22.
- Looney C.R. 1986. Superovulation in beef females. *Proc 5th Ann Conv AETA*, Fort Worth, Tx, USA, 16-29.
- Looney C.R., Bondioli K.R., Hill K.G., Massey J.M. 1988. Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, 29:271 (abstract).
-

- Lovie M., García A., Hackett A., Mapletoft R.J. 1994. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to fooltropin in holstein cows. *Theriogenology*, 41:241.
- Lundy T., Smith P., O`Connell A., Hudson N.L., McNatty K.P. 1999. Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fert*, 115:251-262.
-
- Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD. 2000. A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules*, 1: 208–218.
- Lussier J.G., Matton P., Dufour J.J. 1987. Growth rates of follicles in the bovine ovary. *J. Reprod.Fertil*, 81:301-307.
- Lyman D.J., Rowland S.M. 1985. “Encyclopedia of Polymer Science and Engineering” Krosschwitz J.I. Wiley & Sons, Nueva York, pp. 267.
- Machado S.A., Reichenbach H.D., Weppert M., Matos L.F., Wolf E., Goncalvez P.B.D. 2003. Variabilidade da puncao folicular transvaginal e da producao in vitro de embrioes em vacas gemeas monozigoticas. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31:442-43 (Abstract).
- Macmillan K.L., Thatcher W.W. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 45:883-889.
- Maeda K., Ohkura S., Uenoyama Y., Wakabayashi Y., Oka Y., Tsukamura H., Okamura H. 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research*, 1364:103-115.
- Malhi P.S., Adams G.P., Singh J. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal and endocrine characteristics. *Biol Reprod*, 73:45–53.
- Mapletoft R.J., Gonzalez A., Lussier J. 1988. Superovulation of beef heifers with Folltropin of FSH-p. *Theriogenology*, 29:274 (abstract).
- Mapletoft R.J., Bó G.A., Murphy B.D. 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., Nasser L.F., Bó G.A., Del Campo M.R. 1992. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. *Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands*, 1:237-239.
-

- Mapletoft R.J., Pierson R.A. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, 11:14-24.
- 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.
- Mapletoft R.J., Steward K.B., Adams G.P. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod Nutr Dev*, 42:1-11.
- Marion G.B., Gier H.T., Choudary J.B. 1968. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J Anim Sci*, 27:451-465.
- Martin T.L., Fogwell R.L., Ireland J.J. 1991. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, 44:693-700.
- Martins A., Jr. Takada L., Abrahao R.G., Freitas C.P., Calegari R.S. 2007. Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize in vitro bovine embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae* 35:1194 (abstract).
- 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 heifers. *Anim Reprod Sci*, 57:23-33.
- Martinez M.F., Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 2003. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. *Theriogenology*, 59:224 (abstract).
- Massey J., Oden A. 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology*, 21:196-217.
- Matton P., Adalakoun 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.
- 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.
- Meyer K., Palmer J.W. 1934. The polysaccharide of vitreous humor. *J Biol Chem*, 107:629-634.
- Meyer K. 1947. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27:335-357.

- Monniaux D., Chupin D., Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Monniaux D., Drouilhet L., Rico C., Estienne A., Jarrier P., Touzé J.L., Sapa J., Phocas F., Dupont J., Dalbies-Tran R., Fabre S. 2013. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev*, 25:1–16.
- Moor R.M., Kruij T., Green D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Mossa F., Jimenez-Krassel F., Walsh S., Berry D.P., Butler S. 2010. The inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotrophins is not influenced by the number of ovarian follicles .3mm in diameter in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*, 22:550–557.
-
- Morimoto K, Metsugi K, Katsumata H. 2001 Effects of lowviscosity sodium hyaluronate preparation on the pulmonary absorption of rh-insulin in rats. *Drug Dev Ind Pharm*; 27:365–371.
- 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 B.D., Martinuk D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12: 27-44.
- Murphy M.G., Enright W.J., Crowe M.A. 1991. Effect of dietary-intake on pattern of growth of dominant follicles during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92:333-338.
- Nagel J., Svec D., Water T., Fireman P. 1977. IgE synthesis in man. Part I. Development of specific IgE antibodies after immunization with tetanus–diphtheria (TD) toxoids. *J Immunol*, 118:334–41.
- Nasser L., Adams G.P., Bó G.A., Mapletoft R.J. 1993. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-724.
- Ochoa J.C., Ramírez R.R.A., Piccardi M.B., Bó G.A., Tríbulo R. J. 2009. Influencia de la estacion en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de Septiembre. CD.
-

- Palasz A.T., Rodriguez-Martinez H., Beltran-Breña P., Perez-Garnelo S., Martinez M.F., Gutierrez-Adan A., De la Fuente J. 2006. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol Reprod Dev*, 73:1503-11.
- Pawlvshyn V., Lindsell C.E., Braithwaite M., Maoletoft R.J. 1986. Suoerovulation of beef cows with FSH-P: a dose response trial. *Theriogenoiogy*, 25:1-9.
- Perry G. 2013. 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *IETS Newsletter*, 1-23.
- Pierson R.A., Ginther O.J. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, 21:495-504.
- Pierson R.A., Ginther O.J. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29:21-37.
- Pontes J.H.F., Melo Sterza F.A., Basso A.C., Ferreira C.R., Sanches B.V., Rubin K.C.P., Seneda M.M. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from alarge-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75:1640-46.
- Pursley J.R., Mee M.O., Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44:915-923.
- 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.
- Rajesh S.J. 2007. Regulation of follicular wave pattern in cattle. Thesis PhD. University of Saskatchewan, Saskatoon SK, Canada, 169 pp.
- Rathbone M.J., Kinder J.E., Fike K., Kojima F., Clopton D., Ogle C.R., Bunt CR. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev*, 50: 277-320.
- Ribadu A.Y., Nakada K., Moriyoshi M., Zhang W.C., Tanaka Y., Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci*, 64:21–31.
- Rico C., Drouilhet L., Salvetti P., Dalbie`s-Tran R., Jarrier P., Touze´ J.L., Pillet E., Ponsart C., Fabre S., Monniaux D. 2012. Determination of anti-Mullerian hormone

- concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev*, 24:932–944.
- Robertson L., Cattoni I.C., Shand R.I., Jeffcoate I.A. 1993. A critical evaluation of ultrasonic monitoring of superovulation in cattle. *Br. Vet*, 149:477–484.
- Rubin K.C.P., Pontes J.H.F., Nonato I., Ereno J.C., Pansard H., Seneda M.M. 2005. Influence of Nelore blood on the in vivo production of oocytes. *Acta Scientiae Veterinariae* 33:183 (abstract).
- Sakurai K, Miyazaki K, Kodera Y. 1997. Anti-inflammatory activity of superoxide dismutase conjugated with sodium hyaluronate. *Glycoconj J*, 14: 723–728.
- Sartori S., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J.N., Parrish J.J., Wiltbank M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in Winter. *J Dairy Sci*, 85:2803-2812.
- 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.
- Satoh H., Numabe T., Takada T., Oikawa T., Kifune A., Watanabe G., Taya K. 1996. Superovulation in Japanese beef cows using polyvinylpyrrolidone (PVP) as the vehicle for porcine FSH (pFSH). *Theriogenology*, 45:332.
- 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.
- Schallenberger E., Schams D., Bullerman B., Walters D.L. 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Fert*, 71:493-501.
- Schams D., Menzer D., Schalenberger E., Hoffman B., Hahn J., Hahn R. 1977. Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: *Control of Reproduction in the Cow*. Sreenan JM (ed.), Martinus Nijhoff: The Hague, 122-142.
- Schams D. Luteal peptides and intercelular communication. 1987. *J Reprod Fert*, 34:87-99.
- 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.

- Shea B., Jansen R., Mc Dermand R. 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period *Theriogenology*, 21:186-195.
- Singh J., Dominguez M., Jaiswal R., Adams G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory 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.
- Spicer A.P., Augustine M.L., McDonald J.A. 1996. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. *J Biol Chem*, 271:234–6.
- Stock A.E., Fortune J.E. 1993. Ovarian follicular dominance en cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132:1108-1114.
- 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.
- Sutherland W. 1991. *Biomaterials. Novel material from biological sources.* Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, pp 307-333.
- Stevenson J.S. 1994. Update of reproductive endocrine function in the bovine female. *Proc. Society for Theriogenology Annual Meeting, Kansas City, Missouri*, 38-49.
- Stoebel D.P., Moberg G.P. 1982. Repeated acute stress during the follicular pAHse and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci*, 65:92–6.
- Stojkovic M., Thompson J.G., Tervit H.R. 1999. Effects of hyaluronic acid supplementation on in vitro development of bovine embryos in a two-step cultura system. *Theriogenology*, 51:254 (abstract).
- Stojkovic M., Kolle S., Peinl S., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Thompson J., Wenigerkind H., Reichenbach H., Sinowatz F., Wolf E. 2002. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozenthawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*, 124:141-153.

- Stringfellow D.A., Givens M.D. 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS.
- Swann D.A., Kuo J.W. 1991. "Hyaluronic acid". Biomaterials – Novel material from biological sources. Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, pp 285-307.
- Takedomi T., Kishi H., Medan M.S., Aoyagi Y., Konishi M. 2005. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. J. Reprod. Dev, 51:341-346.
- Tammi R., Ågren U.M., Tuhkanen A.L., Tammi M. 1994. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 29:1–81.
- Thibier M. 2003. The International Embryo Transfer Society Data Retrieval Committee Annual Report. Report. Embryo Transfer Newsletter, 21:12-19.
- Thibier M. 2004. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. In: IETS Embryo Transfer Newsletter. A Publication of the International Embryo Transfer Society, 22:12–9.
- Tirone E., D'Alessandris C., Hascall V.C., Siracusa G., Salustri A. 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). J Biol Chem, 272:4787-4794.
- Toosi B.M., Tribulo A., Lessard C., Mastromonaco G.F., McCorkell R.B., Adams G.P. 2013. Superovulation and Embryo Transfer in Wood Bison (*Bison bison athabascae*). Theriogenology, 80:542-551.
- Tríbulo H., Bó G.A., Jofre F., Carcedo J., Alonso A., Mapletoft R.J. 1991. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. Theriogenology, 35:286 (abstract).
- Tríbulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Alasino R.V., Beltramo D., Bianco I., Mapletoft R.J., Bó G.A. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. Anim Reprod Sci, 129:7-13.

- Tríbulo A., Rogan D., Tríbulo H., Tríbulo R., Mapletoft R.J., Bó G.A. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of follitropin-v in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77:1679-1685.
- Van den Hurk R., Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751.
- Van Donkersgoed J., Dussault M., Knight P., Byers L. 2008. Clinical Efficacy of a Single Injection of Ceftiofur Crystalline Free Acid Sterile Injectable Suspension versus Three Daily Injections of Ceftiofur Sodium Sterile Powder for the Treatment of Footrot in Feedlot Cattle. *Veterinary Therapeutics*, 9:157-162.
- Volk V.K., Bunney W.E. 1942. Diphtheria immunization with fluid toxoid and alum-precipitated toxoid. *Am J Public Health*, 32:690-9.
- Walls RS. 1977. Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in nonantigen-dependent mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med*, 156:431-5.
- Walsh J.H., Mantovani R., Duby R.T., Overstrom E.W., Dobrinsky J.R., Enright W.J., Roche J.F., Boland M.P. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology*, 40:313-321.
- Wang H., Wu M., Patt D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1988. Superovulation in beef heifers with PMSG: Effect of dose and monoclonal antibodies to PMSG. *Theriogenology*, 29:323.
- Washburn K., Johnson R., Clarke C.R., Anderson K., Lucas M., Bryson W., Robinson J., Dame K., Hubbard V., Callahan K., Robb E. 2005. Penetration of ceftiofur into sterile vs. Mannheimia AHemolytica infected tissue chambers in beef calves after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension in the ear pinna. *J Vet Pharmacol Ther*, 8:47-51.
- Watanabe K., Yamaguchi Y. 1996. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J Biol Chem*, 271:22945-8.
- Watanabe M.R., Watanabe Y.F., Franceschini P.H., Dayan A., Lobo R.B. 1999. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and in vitro embryo production. *Theriogenology*, 51:438 (abstract).

- Willmot N., Saunders J., Bó G.A., Palasz A., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1990. The effect of FSH/LH ratios in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology*, 33:347 (abstract).
- Wilson J.M., Moore K., Jones A.L., Looney C.R. 1989. Recombinant bovine follicle-stimulating hormone: dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*, 31:273 (abstract).
- Yamamoto M., Oow M., Kawaguchi M., Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41:747-755.