

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

***ESTUDIO DE FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA
SUPEROVULATORIA EN BOVINOS***

CALLEJAS, Santiago Saúl

DIRECTOR: ALBERIO, Ricardo

CO-DIRECTORES: CABODEVILA, Jorge
DULOUT, Fernando

Lugar de Trabajo:

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del
Centro de la Provincia de Buenos Aires.
Unidad Integrada: Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP),
Instituto Nacional de Tecnología Agrapecuaria (INTA) Balcarce.

MIEMBROS DEL JURADO:

De La Sota, R. Luzbel
Garnero, Oscar
Russo, Angel

Dedicatoria

❖ A mis Padres, por su esfuerzo, apoyo y confianza permanente

Gracias Papá!!! porque, a pesar que no estas físicamente a mi lado, me seguís guiando desde mi corazón.

Gracias Mamá por estar a mi lado

❖ A Adriana, por alentarme y apoyarme con su comprensión en la realización de la tesis.

Agradecimientos

- *A Ricardo Alberio, quién me guió en mi formación académica.*
- *A mis amigos, Jorge, Rodolfo y Miriam, quienes estuvieron a mi lado y enriquecieron mi formación humana y académica*
- *A Pablo Burges quien, con su responsabilidad y eficiencia, colaboró en los trabajos de campo.*
- *Al personal de la Reserva 7 del INTA Balcarce.*
- *A Fernando Dulout.*
- *A Victoria Calá y Gastón Meana Irigoyen, quienes colaboraron en los trabajos de campo.*
- *A toda persona que colaboró para que esta tesis sea una realidad.*

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Summary	3
I. Introducción general	5
II. Revisión bibliográfica	6
1. Rol de la Gonadotropina utilizada	6
1.1. Extractos pituitarios	6
1.2. Relación FSH/LH	
1.3. Dosis	7
1.4. Vía de administración y frecuencia de inyecciones	8
1.5. Gonadotropina Coriónica Equina	9
1.6. Gonadotropina Menopáusica Humana	10
1.7. Esquema de administración de las diferentes gonadotropinas	10
2. Rol del estado del ovario al inicio del tratamiento superovulatorio	12
2.1. Dinámica folicular	12
2.2. Dinámica folicular y respuesta superovulatoria	14
III. Trabajos experimentales	16
1. Uso de FSH-P y GCe	16
1.1. El uso de FSH-P en dosis única o de FSH-P en dosis reducidas combinadas con GCe como forma de modificar la respuesta superovulatoria	16
1.1.1. Introducción	16
1.1.2. Objetivos	17
1.1.3. Hipótesis	17
1.1.4. Materiales y métodos	17
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	17
B. Detección de celos y servicios	18
C. Respuesta superovulatoria	19
D. Recolección y evaluación de embriones	19
E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal	19
F. Nivel de progesterona y respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica	20
G. Análisis estadístico	20

1.1.5. Resultados	22
A. Respuesta superovulatoria y celo post tratamiento	22
B. Intervalo prostaglandina-celo	22
C. Cuerpos lúteos y folículos	23
D. Embriones y ovocitos sin fertilizar	23
E. Relación entre el estadio del folículo dominante en el momento de iniciar un tratamiento superovulatorio y el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y ovocitos no fertilizados	25
F. Relación entre el nivel de progesterona plasmática en el día de inicio del tratamiento superovulatorio y el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y ovocitos sin fertilizar	26
1.1.6. Discusión	26
1.1.7. Conclusiones	30
1.2. El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de GCe como tratamiento superovulatorio	31
1.2.1. Introducción	31
1.2.2. Objetivo	31
1.2.3. Hipótesis	31
1.2.4. Materiales y métodos	31
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	31
B. Detección de celos y servicios	32
C. Respuesta superovulatoria	32
D. Recolección y evaluación de embriones	32
E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormona	32
F. Nivel de progesterona y respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica	32
G. Análisis estadístico	33
1.2.5. Resultados	33
A. Respuesta superovulatoria y celo post tratamiento	33
B. Intervalo prostaglandina-celo	34
C. Cuerpos lúteos y folículos	34
D. Embriones y ovocitos sin fertilizar	34

E. Relación entre el estadio del folículo dominante y el número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar	35
F. Relación entre el nivel de progesterona plasmática en el día de inicio del tratamiento superovulatorio y respuesta ovárica al mismo	36
1.2.6. Discusión	37
1.2.7. Conclusiones	38
2. Control de la dinámica folicular mediante la administración de progesterona. Su importancia en tratamientos superovulatorios	40
2.1. Evaluación de tres dosificaciones de progesterona exógena para inducir niveles endógenos capaces de controlar la onda de crecimiento folicular.	40
2.1.1. Introducción	40
2.2.2. Objetivo	40
2.1.3. Hipótesis	40
2.1.4. Materiales y métodos	41
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	41
B. Detección de celos	41
C. Estudios ecográficos, muestreos sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal	41
D. Análisis estadístico	42
2.1.5. Resultados	44
A. Nivel de progesterona plasmática	44
B. Dinámica folicular	44
B.1. Folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular	44
B.2. Clases foliculares	45
C. Diámetro del cuerpo lúteo	48
2.1.6. Discusión	49
2.1.7. Conclusiones	51
2.2. Efecto del nivel de progesterona plasmática modificado por inyecciones intramusculares sobre la respuesta superovulatoria	52

2.2.1. Introducción	52
2.2.2. Objetivo	52
2.2.3. Hipótesis	52
2.2.4. Materiales y métodos	53
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	53
B. Detección de celos y servicios	53
C. Respuesta superovulatoria	54
D. Recolección y evaluación de embriones	54
E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal	54
F. Nivel de progesterona y respuesta superovulatoria	54
G. Análisis estadísticos	54
2.2.5. Resultados	55
A. Nivel de progesterona plasmática	56
B. Dinámica folicular	56
B.1. Folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular	56
B.2. Clases foliculares	57
C. Respuesta superovulatoria	59
C.1. Población folicular en el día del celo (control) o celo esperado (P600)	59
C.2. Porcentaje de vacas con respuesta y número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar en el tratamiento Control	59
C.3. Efecto del estadio del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria	60
C.4. Efecto del nivel de progesterona plasmático al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo	61
C.5. Relación entre los folículos ≥ 8 mm al momento del celo y ovulación	61
C.6. Respuesta superovulatoria estimada en el grupo P600	61
2.2.6. Discusión	62
2.2.7. Conclusiones	64
2.3. Efecto del nivel de progesterona modificado por progesterona exógena aplicada por medio de esponjas intravaginales sobre la dinámica folicular	65
2.3.1. Introducción	65

2.3.2. Objetivo	65
2.3.3. Hipótesis	65
2.3.4. Materiales y métodos	66
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	66
B. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal	67
C. Detección de celos	67
D. Análisis estadístico	68
2.3.5. Resultados	69
A. Nivel de progesterona plasmática	69
B. Dinámica folicular	70
B.1. Folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular	70
B.2. Clases foliculares	71
C. Relación entre el nivel de progesterona y la onda ovulatoria	73
D. Diámetro del cuerpo lúteo	73
2.3.6. Discusión	74
2.3.6. Conclusiones	76
2.4. Efecto del nivel de progesterona plasmática modificado por esponjas intravaginales impregnadas con progesterona sobre la respuesta superovulatoria	78
2.4.1. Introducción	78
2.4.2. Objetivo	78
2.4.3. Hipótesis	78
2.4.4. Materiales y métodos	79
A. Lugar, animales experimentales y tratamientos	79
B. Detección de celos y servicios	79
C. Respuesta superovulatoria	79
D. Recolección y evaluación de embriones	80
E. Estudios ecográficos, muestreos sanguíneos, procesamiento de las muestras y medición hormonal	80
F. Nivel de progesterona y respuesta superovulatoria	80
G. Análisis estadísticos	80
2.4.5. Resultados	82
A. Nivel de progesterona plasmática	82
B. Dinámica folicular	83

<i>B.1. Folículo dominante de la primer onda de crecimiento folicular</i>	83
<i>B.2. Clases foliculares</i>	84
<i>D. Respuesta superovulatoria</i>	86
<i>D.1. Porcentaje de vacas con respuesta</i>	86
<i>D.2. Celo post tratamiento e intervalo prostaglandina-celo</i>	86
<i>D.3. Cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables</i>	86
<i>D.4. Embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar</i>	87
<i>D.5. Efecto del estadio del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria</i>	87
<i>D.6. Efecto del nivel de progesterona plasmático al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo</i>	88
<i>E. Población folicular al inicio del tratamiento de estimulación ovárica</i>	89
2.4.6. Discusión	89
2.4.7. Conclusiones	93
IV. Aportes de la tesis y prospectiva	94
V. Bibliografía	100

ESTUDIO DE FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN BOVINOS

Palabras clave: superovulación, FSH-P, polivinil pirrolidona, progesterona, folículo dominante.

Resumen

Se realizaron 6 experimentos (E) con la finalidad de estudiar diversos factores que afectan la respuesta superovulatoria en bovinos. Se hicieron estudios ecográficos para determinar estructuras foliculares y luteales y muestreos sanguíneos para cuantificar los niveles plasmáticos de progesterona (P). En los E 1.1 y 1.2 se utilizaron vaquillonas y vacas, con ciclos estrales regulares, de raza Aberdeen Angus con el objetivo de estudiar el efecto de aplicar FSH-P en dosis única o de FSH-P en dosis reducida (subcutánea + intramuscular) combinada con eCG (subcutánea) sobre la respuesta superovulatoria. Se observó que la combinación de dosis reducida de FSH-P y de eCG administradas en un mismo momento permitieron obtener una respuesta superovulatoria equivalente a aquélla observada luego de aplicar 8 inyecciones de FSH-P separadas por 12 horas cada una ($4,5 \pm 0,7$ y $5,5 \pm 0,5$ embriones totales respectivamente, $P > 0,05$). Esta respuesta fue el resultado del efecto asociado de ambas gonadotropinas y no de una de ellas en particular (E 1.2). Por otro lado, la disminución en el número de inyecciones de FSH-P a una sola administración utilizando un medio de liberación lenta (polivinil pirrolidona, PVP) no fue efectiva para obtener una respuesta superovulatoria ($0,7 \pm 0,4$ embriones totales, E 1.1). En los E 2.1 a 2.4 sólo se utilizó la categoría vaca. En el E 2.1 se evaluaron diferentes dosis de P administradas por vía intramuscular para determinar aquella dosis que mejor controlare la dinámica folicular. Ésta, fue modificada por inyecciones diarias de 200, 400 o 600 mg de P/día, vía intramuscular, del día 3 al 9 del ciclo estral. Se deprimió la tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño y aumentó el número de folículos de 3 a 4 mm de diámetro. En el E 2.2 se estudio la respuesta superovulatoria de vacas a las que se realizaron tratamientos para controlar la dinámica folicular mediante la suplementación con P por vía de inyecciones intramusculares (600 mg de P/día). A las 12 horas de finalizado el tratamiento superovulatorio, se observó una mayor respuesta folicular en los animales que recibieron P ($13,2 \pm 1,8$ y $4,0 \pm 0,9$ folículos \geq a 10 mm respectivamente, $P < 0,01$). No obstante, la vía por la que fue administrada la P hizo que los niveles plasmáticos de dicha hormona (>1 ng/ml) se mantuvieran por un período prolongado luego de la última administración lo que provocó ausencia de ovulación. En el E 2.3 se utilizó la vía intravaginal para administrar P y se evaluaron diferentes dosis para determinar aquella que mejor controlare la dinámica folicular. Se utilizaron esponjas con 7 g y 11 g de P, las cuales fueron recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral. Se requirieron altas dosis de dicha hormona (11 g/esponja) para obtener un nivel plasmático de P significativamente superior al de una fase luteal normal y provocar cambios en la

dinámica folicular. Por último, en el E 2.4 se evaluó la respuesta superovulatoria de vacas tratadas con esponjas con 11 g de P. El aumento en la concentración hormonal se observó en el 700% de los animales tratados. En aquellos animales con niveles de P aumentado se produjo inhibición del desarrollo del folículo de mayor tamaño y un aumento en el número de folículos de 3 a 4 mm y de 5 a 9 mm de diámetro. No se observó una mejora en la respuesta superovulatoria en relación a la obtenida en los animales no suplementados con dicha hormona ($5,1 \pm 1,0$ y $8,0 \pm 2,0$ embriones totales respectivamente, $P > 0,05$). En el último grupo, ninguno de los animales tuvo un folículo dominante en crecimiento al inicio del tratamiento superovulatorio. En todos los experimentos realizados, la presencia de un folículo dominante en crecimiento al inicio de un tratamiento superovulatorio afectó negativamente la respuesta al mismo (ej. E 1.1: $1,2 \pm 1,1$ vs. $6,3 \pm 0,3$ embriones totales, folículo dominante en fase de crecimiento vs. fases de meseta + regresión; $P < 0,01$). El nivel de P al inicio del tratamiento superovulatorio tuvo un efecto variable sobre la respuesta al mismo. En los E 1.1., 1.2. y 2.4 (grupo con esponjas de 11 g de P) los animales que tuvieron un nivel de P igual o mayor a 5 ng/ml de plasma presentaron una mayor respuesta superovulatoria comparado con aquellos con un nivel menor. Este no fue el caso de lo ocurrido en los E 2.2. y 2.4 (grupo control). Diferencias en la dinámica folicular explicarían las divergencias observadas. De los experimentos realizados se concluye que: a) la combinación de dosis reducidas de FSH-P (subcutánea + intramuscular) y eCG (subcutánea), administradas en un mismo momento inducen una respuesta superovulatoria similar a la que se obtiene con el tratamiento tradicional de FSH-P administrado durante 4 días en dosis decrecientes, y es debida al efecto combinado de ambas gonadotrofinas; b) la administración de FSH-P disuelta en PVP, administrada en una dosis intramuscular, no induce respuesta superovulatoria; c) niveles de progesterona superiores a 15 ng/ml (600 mg/día de progesterona) a partir del día 5 del ciclo estral inhiben el desarrollo del folículo dominante, aumentan la población de folículos de 3-4 mm y afectan el desarrollo del cuerpo lúteo; d) la estimulación ovárica con Foltropin V® en animales que reciben una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral produce, 12 horas posteriores a la última inyección del tratamiento superovulatorio, una población de folículos \geq a 10 mm superior a la de aquellos animales que no reciben suplementación hormonal; e) el uso de esponjas intravaginales con 11 g de progesterona, recambiadas diariamente entre los días 3 y 7 del ciclo estral, inhibe el desarrollo del folículo de mayor tamaño y aumenta la población de folículos de 3-4 mm y 5-9 mm; f) el tratamiento superovulatorio iniciado en el día 7 en vacas que reciben progesterona, vía esponjas intravaginales (11 g), recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral, no mejora la respuesta superovulatoria que se obtiene en animales sin tratamiento de progesterona y con ausencia de folículo dominante en crecimiento y g) la presencia de un folículo dominante en crecimiento afecta negativamente la respuesta a un tratamiento superovulatorio.

STUDY OF FACTORS AFFECTING SUPEROVULATORY RESPONSE IN BOVINE CATTLE

Key Words: superovulation, FSH-P, polyvinylpyrrolidone, progesterone, dominant follicle

Summary

Six experiments (**E**) were carried out aimed at studying different factors affecting superovulatory response in bovine cattle. Ecographic studies were performed to determine follicular and luteal structures and blood samples were taken to quantify progesterone plasmatic levels (**P**). In order to consider the effects on superovulatory response of a unique dose of FSH-P or a reduced dose of FSH-P (subcutaneous + intramuscular) combined with eCG (subcutaneous), Aberdeen Angus heifers and cows, both of regular estrous cycles, were used for **E** 1.1 and 1.2. Therefore, it was observed that the combination of the reduced dose of FSH-P and eCG concurrently supplied gave place to a superovulatory response equivalent to that observed after 8 FSH-P injections, each one provided after a 12 hour period (4.5 ± 0.7 and 5.5 ± 0.5 total embryos respectively, $P > 0.05$). This response resulted from the associated effect of both gonadotrophines and not from one of them in particular (**E** 1.2). On the other hand, the decrease in the FSH-P injection number up to one slowly released injection (polyvinylpyrrolidone, PVP) was not effective so as to obtain superovulatory response (0.7 ± 0.4 total embryos, **E** 1.1). Only cows were used in **E** 2.1 to **E** 2.4. Regarding **E** 2.1 different intramuscular **P** doses were evaluated to determine the best dose able to control follicle dynamics. This one was modified by daily intramuscular **P** injections of 200, 400 or 600 mg starting from the day 3 to 9 of the estrous cycle. The largest follicle growth rate decreased and the number of follicles with a diameter of 3 to 4 mm increased. Superovulatory response in cows supplemented with **P** intramuscular injections (600 **P** mg /day) to control follicle dynamics was studied in **E** 2.2. Twelve hours after finishing superovulatory treatment, it was observed a better follicle response in those animals receiving **P** (13.2 ± 1.8 and 4.0 ± 0.9 follicles \geq to 10 mm respectively, $P < 0.01$). However, the way in which **P** was supplied kept those hormone plasmatic levels (> 1 ng/ml) for a long period after the last provision which produced absence of ovulation. **P** was supplied via intravaginal in **E** 2.3 and different doses were evaluated to determine the best dose which could control follicle dynamics. Sponges with 7 g and 11 g of **P** were used which were daily replaced starting from day 3 to 7 of the estrous cycle. High doses of that hormone (11 g/sponge) were necessary to obtain a **P** plasmatic level significantly higher than that of a normal luteal phase as well as to cause changes in the follicle dynamics. In the end, superovulatory response of cows treated with 11g **P** sponges was evaluated in **E** 2.4. A hormone concentration increase was observed in 700% of treated animals. In those animals with increased **P** levels, the largest follicle development was inhibited and an increase in the number of follicles having a 3 to 4 mm and a 5 to 9 mm diameter was observed. Superovulatory response was not improved if

compared with that obtained in animals which were not supplemented with that hormone (5.1 ± 1.0 and 8.0 ± 2.0 total embryos respectively, $P > 0.05$). In the last group, none of the animals had a growing dominant follicle at the beginning of the superovulatory treatment. In every experiment the growing dominant follicle at the beginning of the superovulatory treatment negatively affected its response (e.g. E 1.1; 1.2 ± 1.1 vs 6.3 ± 0.3 total embryos, dominant follicle in growing stage vs plateau stage + regression; $P > 0.01$). **P** level at the beginning of the superovulatory treatment had a varying effect on its response. In E 1.1, 1.2 and 2.4 (group with 11g **P** sponges) those animals having a **P** level equal to or higher than 5 ng/ml of plasma recorded a higher superovulatory response if compared to those with a lower level. This did not happen in E 2.2 and 2.4 (control group). Differences in follicle dynamics would explain observed divergences. The following conclusions arose from the experiments: a) the concurrently supplied combination of FSH-P reduced doses (subcutaneous + intramuscular) and eCG (subcutaneous) induced a superovulatory response similar to that obtained with the traditional treatment of FSH-P supplied during 4 days in reduced doses and its due to the combined effect of both gonadotrophines; b) FSH-P diluted in PVP, intramuscular, does not induce a superovulatory response; c) progesterone levels higher than 15 ng/ml (600 mg of progesterone/day) starting from the day 5 of the estrous cycle inhibit the dominant follicle growth, increase the 3-4 mm follicles population and affect the corpora lutea development; d) ovarian stimulation by means of Folltropin V in animals receiving a 600 mg progesterone daily injection, during the day 3 to 7 of the estrous cycle (12 hours after the last superovulatory treatment injection) produces a ≥ 10 mm follicle population higher than that recorded in those animals that do not receive hormone supplement; e) the use of intravaginal sponges with 11 g progesterone daily replaced during the day 3 to 7 of the estrous cycle, inhibits the largest follicle development and increases the 3-4 mm and 5-9 mm follicles population; f) the superovulatory treatment started in day 7 in those cows which received progesterone by means of intravaginal sponges (11g), daily replaced during day 3 to 7 of the estrous cycle, does not improve superovulatory response obtained in animals without progesterone treatment and with an absent growing dominant follicle and, in the end, g) the presence of a growing dominant follicle negatively affects the superovulatory response.

I. Introducción general

La transferencia embrionaria es una técnica que permite optimizar el potencial reproductivo de las hembras de los animales domésticos, como así también una rápida reproducción de individuos exóticos o de razas en peligro de extinción. Además, mediante la congelación de los embriones obtenidos es posible conformar bancos de germoplasma y facilitar el intercambio internacional de material genético (Clement-Sengewald y otros, 1993).

La primera etapa de la técnica de transferencia de embriones consiste en la estimulación de la actividad ovárica de hembras donantes con el objetivo de aumentar el número de ovulaciones y obtener a partir de allí un número elevado de embriones de una calidad adecuada para ser congelados y/o transferidos. Es precisamente este proceso (superovulación) el que presenta mayor variabilidad en relación con los resultados obtenidos, consecuencia de los numerosos factores involucrados (Cabodevila y Torquati, 1993; Kafi y Mc Gowan, 1997).

A continuación se hará una revisión bibliográfica para analizar las características del tratamiento hormonal y de las gonadotrofinas utilizadas, la relación Hormona Folículo Estimulante (FSH) / Hormona Luteinizante (LH), las dosis, las vías de administración y las frecuencias de las aplicaciones. Por último, se analizarán aspectos de la dinámica folicular bovina y la relación de esta con la respuesta superovulatoria.

II. Revisión bibliográfica

1. Rol de la Gonadotropina utilizada

Para realizar tratamientos superovulatorios en bovinos, se utilizan extractos de pituitaria de diferentes especies tales como la porcina (FSH-P, Donaldson, 1984b), la ovina (FSH-o, Gong y otros, 1995), la bovina (FSH-b; Bellows y otros, 1991; Looney y otros, 1988) y la equina (HAP, Staigmiller y otros, 1992). También son utilizadas la Gonadotropina Coriónica equina (eCG; Eldsen y otros, 1978) y la Gonadotropina Menopausica Humana (hMG, Tegegne y otros, 1994). De este conjunto, la FSH-P y la eCG son las más utilizadas y estudiadas actualmente.

1.1. Extractos pituitarios

Los extractos pituitarios provienen, tal como su nombre lo indica, de hipófisis sobre las cuales se realizan procesos de extracción obteniéndose preparados que contienen gonadotropinas (particularmente FSH) con diferente grado de pureza. Este aspecto, basado en la relación FSH/LH, ha sido uno de los primeros factores considerados como fuente de variación en la respuesta al tratamiento. En relación con este aspecto, también son factores de variación tanto la dosis empleada como la forma de administración (fraccionamiento, frecuencia y vía).

Como fue citado anteriormente, dentro de los extractos pituitarios el de origen porcino (FSH-P) es el más utilizado (Donaldson, 1984b), por lo que se hará énfasis en esta gonadotropina en las futuras descripciones.

1.2. Relación FSH/LH

La FSH-P presenta diferentes concentraciones de FSH y de LH (Lindsell y otros, 1986); la contaminación de los preparados con la segunda de estas hormonas, está relacionado con una menor respuesta superovulatoria (Chupin y otros, 1984). Estos autores observaron que a medida que aumentaba la relación FSH/LH (0,1 a 8,7), se obtenía un mayor número de embriones transferibles (0,5 a 5). Otros investigadores (Hasler, 1983; Alberio y otros, 1989; Cabodevila y otros, 1989) han trabajado con relaciones FSH/LH de 0,02 a 5, no observando diferencias en la respuesta superovulatoria. Sin embargo, ello pudo haberse debido a que el número de embriones transferibles obtenido fue bajo (cuatro o menos), por lo que no se pudo observar una respuesta diferencial entre las relaciones estudiadas. Posteriormente, Willmott y otros (1990) demostraron que el contenido de LH afecta negativamente la respuesta superovulatoria. Actualmente, los procesos de purificación se han mejorado, permitiendo disponer de productos con un 80% menos de LH (ej. Foltropin V[®]) que las preparaciones

más antiguas (ej. FSH-P de Schering®; Armstrong y Opavske, 1986). Esta reducción de LH permitió obtener un mayor número de cuerpos lúteos y de embriones que el logrado con preparados estándar de pituitaria porcina (Wilmott y otros, 1990). Alteraciones en la foliculogénesis que conducen a ovulaciones prematuras (Callesen y otros, 1986, 1987), disturbios en la maduración citoplasmática y/o nuclear del ovocito (Callensen y otros, 1986, Moor y otros, 1984, 1985), luteinización de las células granulosas (Armstrong y Opavsky, 1988; Opavsky y Armstrong, 1989) y alteraciones en el pico de LH (Lauria y otros, 1982a), son algunos de los efectos mediante los cuales el contenido excesivo de LH afecta negativamente la respuesta superovulatoria.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que para que se complete la foliculogénesis es necesario disponer de cantidades mínimas de LH (Webb y otros, 1999). Como consecuencia, se ha observado que preparados puros de FSH o con concentraciones extremadamente bajas de LH producen una menor respuesta superovulatoria (Murphy y otros, 1984; Donaldson y Ward, 1986; Chupin y otros, 1987; Herrler y otros, 1991).

En conclusión, la relación FSH/LH cobra importancia cuando hay un exceso de LH ya que perjudica la respuesta superovulatoria por las razones enunciadas previamente y se ha establecido que el máximo nivel de contaminación con dicha hormona que no afecta la respuesta superovulatoria estaría ubicado entre 15 y 20% (Wilmott y otros, 1990). Por lo tanto, la LH no debe ser suprimida de las preparaciones hormonales ya que, en cantidades adecuadas, es necesaria para el crecimiento folicular.

1.3. Dosis

Se han utilizado diferentes dosis de FSH para estimular el crecimiento folicular ovárico observándose que a partir de determinado nivel se produce una buena respuesta superovulatoria, que aumenta a medida que se incrementa la dosis hasta alcanzar una meseta. Posteriormente, mayores aumentos tienden a disminuir la cantidad de embriones de buena calidad (Donaldson, 1984b; Mapletoft y otros, 1988a).

Canseco y otros (1992) propusieron un rango de 28 a 50 mg Armour de FSH-P dentro del cual la respuesta ovulatoria obtenida (7,9 embriones) no se modificaba. Una unidad Armour es equivalente a 1 mg de FSH-P obtenido por el método de Steelman. Pawlyshyn y otros (1986) determinaron que cuando se superó en un 200% la dosis de FSH-P (120 mg Armour) se produjo una disminución significativa en el número de embriones fertilizados. Otros (Mapletoft y otros, 1988b; Gonzalez y otros, 1990) observaron una disminución en el número de embriones fertilizados luego de superados los 30 mg de extracto puro de FSH. Sin embargo, se ha demostrado que la dosis óptima de gonadotrofina para obtener una mayor respuesta superovulatoria varía en función de la raza y la edad de las hembras (Breuel y otros, 1991), lo que podría explicar las diferencias observadas entre investigadores.

Breuel y otros (1991) utilizaron un rango de 25 a 50 mg de FSH-P y observaron que mientras en los animales jóvenes (1 a 2 años de edad) de raza Polled Hereford el número de embriones totales disminuía cuando se aumentaba la dosis de gonadotrofinas, en los viejos ocurría lo contrario (mayor dosis, mayor número de embriones totales). Esta observación coincide con lo informado por Lerner y otros (1986) en la raza Holstein. Los ovarios de los animales jóvenes poseen una mayor sensibilidad a la estimulación gonadotrófica que los de animales adultos y el aumento en la dosis por encima de determinado umbral produce una sobreestimulación ovárica que se traduce en una disminución en el número de embriones recuperados. Muchos folículos comienzan a desarrollar pero pocos son capaces de ovular y la mayoría sufre luteinización o se atresian. Las causas serían un insuficiente aporte sanguíneo a determinados folículos debido a limitantes físicas del ovario para albergar tantos folículos en crecimiento y por otro lado, alteraciones endocrinas con una excesiva producción de esteroides ováricos que interfieren con el propio desarrollo folicular y ovulación. En contraste, en animales de mayor edad el aumento en la dosis de FSH produce un aumento en el número de embriones recuperados. Esto es debido a que en estos animales habría menor disponibilidad de folículos en crecimiento capaces de responder a las gonadotrofinas y el aumento en la dosis de FSH produce una mayor estimulación de folículos secundarios y antrales pequeños (Lerner y otros, 1986). En la raza Simental, se observó una interacción dosis x edad opuesta a la descrita previamente y en la raza Aberdeen Angus no se observó efecto de la dosis ni de la edad sobre el número de embriones totales (Breuel y otros, 1991). En ambas razas las consideraciones mencionadas son válidas dentro del rango de dosis utilizadas (25 a 50 mg).

Por último, se debe tener en cuenta que la dosis total de FSH-P puede ser administrada en fracciones constantes o decrecientes. Esta última forma fue comprobada como la más efectiva por Chupin y Procurer (1982). No obstante, cuando el preparado utilizado contiene un bajo contenido en LH, no se observan tales diferencias (Mapletoft, 1988b).

En conclusión, la dosis de las gonadotrofinas debe ser ajustada para obtener una respuesta superovulatoria adecuada teniendo en cuenta la edad, la raza y la relación FSH/LH. Los preparados actuales, con una relación FSH/LH más apropiada, permiten una aplicación en forma de fracciones de igual cantidad.

1.4. Vía de administración y frecuencia de inyecciones

La FSH se administra, principalmente por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días (Kohram y otros, 1995), no encontrándose un incremento en la respuesta superovulatoria cuando se aumenta el número de días a cinco (Donaldson, 1984b; Donaldson y Ward, 1986). Por ejemplo, Chupin y Procurer (1982) informaron que usando 32 mg de FSH en animales adultos, se obtuvo una mayor respuesta con 4 que con 5 días de administración.

Otra vía de administración posible es la subcutánea. Debido a que esta vía permite que la gonadotropina sea liberada más lentamente, el lapso entre inyecciones puede prolongarse a 24 horas. Sin embargo, la respuesta superovulatoria ha sido menor que la obtenida con la administración intramuscular cada 12 horas en similar período (Walsh y otros, 1993). Otros investigadores han administrado la dosis superovulatoria en una única aplicación, por vía subcutánea, con resultados equivalentes (Bo y otros, 1991; Hockley y otros, 1992; Kasiraj y otros, 1992; Tribulo y otros, 1993; Schallenberger y otros, 1994) o inferiores al obtenido con múltiples inyecciones (Bungartz y Niemann, 1994; Kelly y otros, 1997). En este último trabajo, se planteó una posible interacción entre el contenido de LH y el método de administración. Utilizando preparados con mayor contenido de LH (ej. Pluset®) con una sola aplicación se obtuvieron resultados superovulatorios equivalentes al de múltiples inyecciones, mientras que con preparados con bajo contenido en LH (ej. Foltropin®) los resultados fueron inferiores. No obstante, en el tratamiento Pluset el número de embriones recuperados fue inferior cuando se utilizó una única administración.

Otros trabajos han utilizado a la polivinil pirrolidona como vehículo de liberación lenta para posibilitar la aplicación de la FSH en una única dosis intramuscular (Yamamoto y otros, 1994; Susuki y otros, 1994; Satoh y otros 1996) o subcutánea (Takedomi y otros, 1993, 1995; Satoh y otros, 1996) con una buena respuesta superovulatoria.

En conclusión, la administración intramuscular con inyecciones cada 12 horas durante 4 días aparece como la más aceptada en la mayoría de los estudios. Por el contrario, se requieren mayores trabajos de investigación antes de recomendar la vía subcutánea. De la misma manera, la utilización de un vehículo de liberación lenta constituye una alternativa de interés. No obstante, se requiere la realización de un mayor número de estudios que confirmen los resultados obtenidos hasta el presente.

1.5. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

La eCG es sintetizada en la copas endometriales de la yegua preñada (Allen y Moor, 1972) y es una glicoproteína que tiene actividad FSH y LH (Gonzalez-Mencio y otros 1978). Esta actividad es variable entre yeguas preñadas y en diferentes momentos de la gestación en una misma yegua (Gonzalez-Mencio y otros, 1978).

El efecto superovulatorio de la eCG es inferior al de la FSH-P (Eldsen y otros, 1978; Monniaux y Saumande, 1983; Kudlác y otros, 1991). No obstante, Mc Gowan y otros (1985) obtuvieron resultados similares. Se la ha utilizado en un rango de dosis que varía entre 1500 y 6000 UI (Boland y otros, 1986; Zaoral y otros, 1991; Zeitoun y otros, 1991; Callesen y otros, 1992; Callensen y otros, 1987, 1990; Balakrishnan y otros, 1993) y se requiere de sólo una aplicación intramuscular para provocar el efecto estimulador, debido a que su vida media en el bovino es larga (2 pendientes de desaparición: 36 horas para la primera y 370 horas para la segunda; Yadav y otros, 1986; Murphy y otros, 1991). Sin embargo, y como consecuencia de esta larga vida media, se observan

problemas caracterizados por la presencia de folículos persistentes al momento de realizar la recolección de embriones, perfiles endocrinos anormales y disminución de la calidad embrionaria (Mikel-Jenson y otros, 1982; Betteridge y otros 1981/82; Moor y otros, 1984).

Para moderar los efectos negativos que provoca la prolongada vida media de la eCG se ha utilizado el suero anti-eCG con lo cual se provocó una disminución en el excesivo crecimiento folicular (Dieleman y otros, 1993). No obstante, los resultados obtenidos en la respuesta superovulatoria con eCG y anti-eCG, han sido divergentes. Algunos autores han obtenido una mejora de la respuesta (Kummer y otros, 1980; Dieleman y otros, 1989; Dieleman y otros, 1993), mientras que otros no la han observado (Alfurajji y otros, 1989; Callensen y otros, 1990; 1992; Boland y otros, 1991; Dhondt y otros, 1978; Wang y otros, 1987; Zeitoun y otros, 1991; Alfurajji y otros, 1990; Callensen y otros, 1989; Saumande y otros, 1984). Actualmente todavía se cuestiona la recomendación práctica de utilizar el mencionado suero.

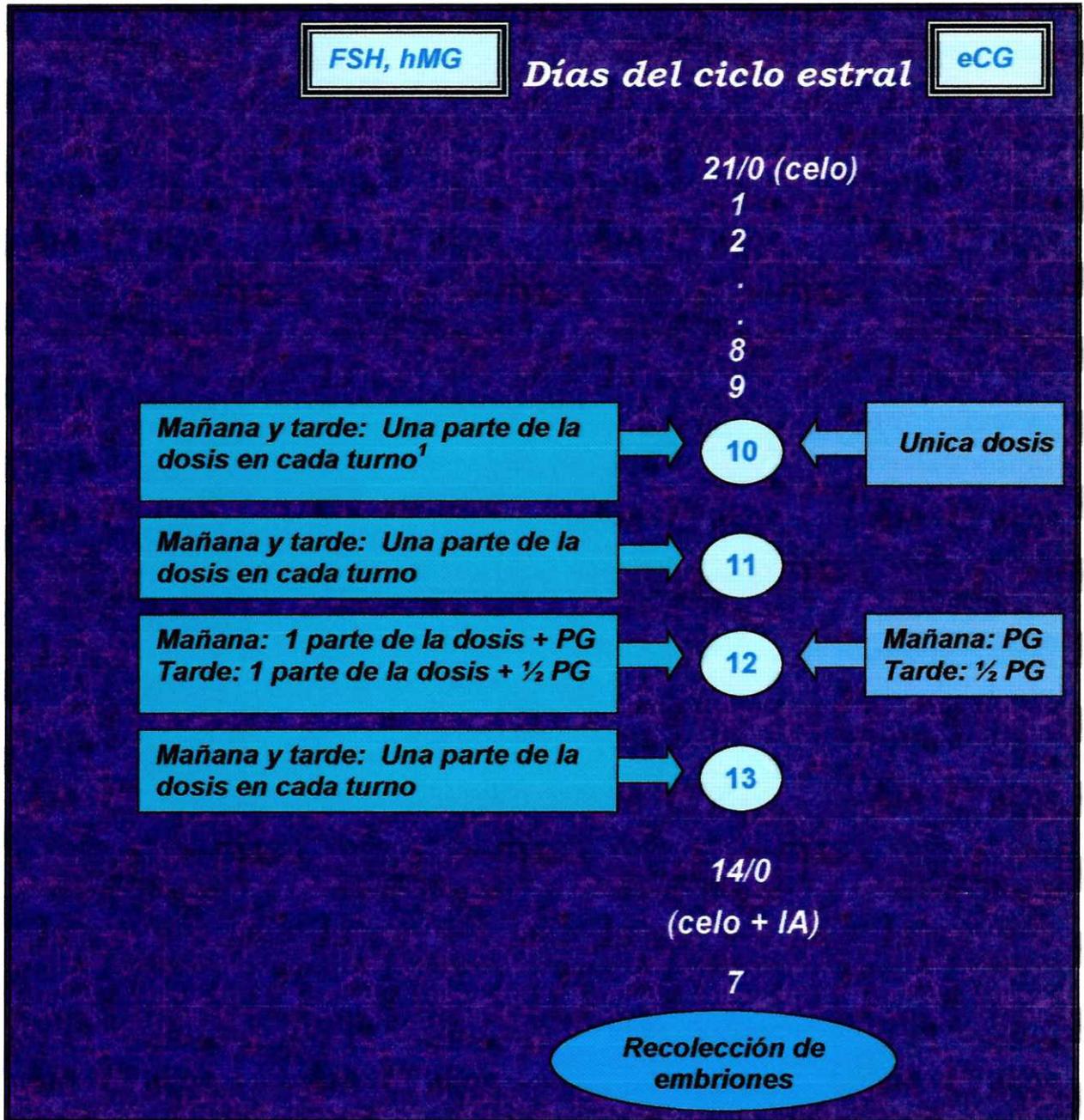
En conclusión, la eCG es una hormona que puede ser utilizada en tratamientos superovulatorios sobre todo cuando las condiciones de trabajo necesitan que los animales sean sometidos a la menor manipulación posible. Además, el costo de este tratamiento es inferior al resto de los utilizados comúnmente. Sin embargo se debe esperar que la respuesta, en particular en su aspecto cualitativo, sea inferior a la obtenida con FSH-P.

1.6. Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG)

La hMG es un producto biológico altamente purificado con igual contenido de FSH y LH que se extrae de la orina de mujer menopáusica (Teegne y otros, 1994). Se administra en forma similar a la FSH-P (Lauria y otros, 1982a; McGowan y otros, 1983) y se obtienen resultados superovulatorios equivalentes a los registrados con eCG (eCG: 11,6 embriones totales y hMG: 11,9 embriones totales, Bono y otros, 1991; Lauria y otros, 1982b) y con FSH-P (Mc Gowan y otros, 1985). No obstante, estos autores obtuvieron un menor número de embriones totales (hMG: 14,3 y FSH-P: 22,8); pero, el número de embriones transferibles no difirió significativamente entre tratamientos (hMG: 7,3; FSH-P: 11). A pesar de esto, el elevado costo de este preparado limita su utilización.

1.7 Esquema de administración de las diferentes gonadotropinas

En el Esquema N°1 se describe la forma de utilización más frecuente de las diferentes gonadotropinas descritas en las secciones previas. Se ha considerado al día 10 del ciclo estral como el día de inicio del tratamiento superovulatorio. Además se indican la frecuencia de inyecciones y se incorpora al agente luteolítico utilizado dentro del esquema de la superovulación.



Esquema N°1. Tratamientos superovulatorios utilizando diferentes gonadotrofinas.

¹La dosis total se puede administrar en fracciones decrecientes o similares durante un período de 4 o 5 días. En el caso de utilizarse 5 días, la prostaglandina (PG) se administra a las 72 hs de comenzado el tratamiento superovulatorio.

2. Rol del estado del ovario al inicio del tratamiento superovulatorio

La dinámica folicular ha sido relacionada con la respuesta superovulatoria: tanto el número de folículos pequeños presentes en el momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica (Romero y otros, 1991) como la presencia o no de un folículo dominante en crecimiento afectan la respuesta al mismo (Savio y otros, 1991).

2.1. Dinámica folicular

En un principio se propuso que el crecimiento folicular ocurría en forma continua e independiente del ciclo estral, aumentando el número total de folículos grandes a medida que se aproximaba el momento de la ovulación (Spitcer y Echtenkamp, 1986). No obstante, Rajakoski (1960, citado por Roche y Boland, 1991) había propuesto la existencia de ondas de crecimiento folicular.

Rajakoski (1960; citado por Roche y Boland, 1991) sostenía la existencia de dos ondas de crecimiento folicular ubicadas entre los días 3 a 12 y 13 a 0 del ciclo estral. Posteriormente, con el advenimiento de la ultrasonografía y su corroboración como un método efectivo para realizar el seguimiento y evaluación de la actividad folicular ovárica (Pierson y Ginther, 1984), diversos investigadores confirmaron la presencia de ondas de crecimiento folicular (Pierson y Ginther, 1987b, 1988; Ireland y Roche, 1983; Savio y otros, 1988; Sirois y Fortune, 1988; Ginther y otros, 1989b; Turziillo y Fortune, 1990).

Una onda de crecimiento folicular se caracteriza por presentar fases de reclutamiento, selección, dominancia de folículos (Hodgen, 1982; citado por Lucy y otros, 1992) y finalmente de atresia, sólo en aquellos folículos no ovulatorios (Sunderland y otros, 1994).

La fase de *Reclutamiento* está caracterizada por la presencia de una cohorte de folículos que comienza a desarrollarse simultáneamente con un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permite avanzar hacia la potencial ovulación.

La fase de *Selección*, es el proceso por el cual un folículo de la cohorte que se está desarrollando es elegido para evitar la atresia posibilitando su llegada a la potencial ovulación.

La fase de *Dominancia* es el proceso por el cual el folículo seleccionado domina el panorama ovárico ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, es responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos.

Por último, la fase de *atresia* involucra la desaparición del folículo dominante no ovulatorio (Savio y otros, 1988; Sunderland y otros, 1994).

Al comienzo del ciclo estral, se produce el reclutamiento de una cohorte de folículos del conjunto de folículos antrales más pequeños (2 a 4 mm) producto del segundo pico de FSH que ocurre luego de la ovulación (Turzillo y Fortune, 1990). Después de 2 a 4 días (días 2, 3, y 4 del ciclo estral), se detectan por ultrasonografía varios folículos de un tamaño medio, de 6 a 9 mm (Lucy y otros, 1992). Inmediatamente después de este período comienza el de selección, producto del aumento transitorio de FSH (Sunderland y otros, 1994). En él, un folículo emerge del conjunto de folículos reclutados y continúa creciendo (Pierson y Ginther, 1987a). Posteriormente, este folículo se transforma en dominante (período de dominancia) e inhibe el crecimiento de los demás (Pierson y Ginther, 1987a; Lucy y otros, 1992; Adams y otros, 1993). A este folículo se lo define como un gran folículo (>10 mm de diámetro) que ha sido reclutado y seleccionado de una onda de crecimiento folicular (Lucy y otros, 1992). Una vez que el crecimiento folicular ha comenzado, la secuencia de las fases antes mencionadas requiere no solamente la presencia de gonadotrofinas (Gong y otros, 1996; Lussier y otros, 1994) sino también de péptidos intraováricos tales como la activina, la folistatina (Findlay, 1994) y la inhibina (Martin y otros, 1991).

El número de ondas presentes en cada ciclo varía de 1 a 4 (Savio y otros, 1988; Knof y otros, 1989; Ginther y otros, 1989a; Purseley y otros, 1993) siendo predominantes los animales que presentan 2 (Knopf y otros, 1989; Kaneko y otros, 1991; Taylor y Rajamahendran, 1991a; Figueiredo y otros, 1995; Ahmad y otros, 1997) ó 3 ondas (Savio y otros, 1988; Savio y otros, 1993b).

En un ciclo estral con 2 ondas de crecimiento folicular, la maduración del segundo folículo dominante coincide con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con la ovulación del mismo (Knopf y otros, 1989; Ginther y otros, 1989a). Cuando se presentan tres ondas de crecimiento folicular (Savio y otros, 1988; Sirois y Fortune, 1988) el ciclo estral tiene mayor duración, debido a que se posterga el celo al no ovular el segundo folículo dominante y, en consecuencia, el tercer folículo requiere de un tiempo para madurar y poder ovular.

La tasa de crecimiento (mm/día) del folículo dominante desarrollado al comienzo o al final del ciclo estral es mayor que la de aquel que se desarrolla en la mitad de la fase luteal (Savio y otros, 1988), indicando que el nivel de progesterona afecta dicha tasa de crecimiento. Esta hormona ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH y esto, afecta el desarrollo de dicho folículo dominante (Savio y otros, 1993b; Stock y Fortune, 1993). El folículo que se desarrolla durante la mitad de la fase luteal estaría expuesto a una menor secreción pulsátil de LH que aquellos que se desarrollan al comienzo o al final del ciclo estral y en consecuencia tiene una menor tasa de crecimiento

Con respecto al mecanismo responsable de la regresión del folículo no ovulatorio, se ha propuesto que una disminución en la frecuencia de los pulsos de LH debida a los

altos niveles de progesterona (Taylor y otros, 1994), provocaría una menor síntesis de andrógenos y en consecuencia una menor síntesis de estradiol (Lucy y otros, 1992; Savio y otros, 1993b). No obstante, Manikkam y Rajamahendran (1997) sugirieron que la atresia del folículo dominante estaría relacionada con una menor actividad de la enzima responsable de la transformación de los andrógenos en estrógenos (aromatasa) de las células granulosas y no por una falta de sustrato (andrógenos). Estos autores concluyeron que existiría un aumento de la proteína fijadora del Factor de crecimiento similar a la insulina –IGF- (IGFBPs) con una consecuente disminución en la disponibilidad de IGF-I y II que provocaría una disminución de la actividad de la enzima aromatasa y en consecuencia una menor síntesis de estrógenos.

Por último, el cuerpo lúteo tendría un efecto intraovárico sobre la dinámica folicular. Se ha encontrado una mayor cantidad de folículos ≥ 2 mm en el ovario en que había un cuerpo lúteo (Pierson y Ginther, 1987b). Además, en el ovario derecho se observó una mayor actividad folicular en coincidencia con una mayor frecuencia de ovulación (Pierson y Ginther, 1987b) y por ende, una mayor presencia de cuerpos lúteos.

2.2. Dinámica folicular y respuesta superovulatoria

La presencia de un folículo dominante en el momento de comenzar un tratamiento de superovulación ha sido mayoritariamente correlacionada en forma negativa con la respuesta al mismo (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995). Sin embargo, otros autores no han encontrado tal efecto (Wilson y otros, 1990; Gray y otros, 1992; Maciel y otros, 1995).

Tal como fue mencionado anteriormente, el folículo dominante en su fase de crecimiento inhibe el desarrollo de los otros folículos (Pierson y Ginther, 1988; Sirois y Fortune, 1988; Guilbault y otros, 1991), por medio de mecanismos endócrinos, parácrinos y autócrinos. Fundamentalmente, se produce un aumento en la concentración de estrógenos y de inhibina que inhiben la secreción de FSH (Martín y otros, 1988). Se afecta así el crecimiento de los folículos subordinados y no del dominante que al disponer de un alto número de receptores para FSH y LH puede ser estimulado aún con muy bajos niveles de gonadotrofinas (Findlay, 1986, citado por Bungartz y Niemann, 1994). De esta manera, el efecto inhibitorio que ejerce el folículo dominante sobre la población folicular explica la menor respuesta que se observa en los animales que tienen este tipo de folículos al inicio del tratamiento de estimulación (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995).

La ausencia de un folículo dominante en crecimiento permite un aumento del número de folículos pequeños (Lucy y otros, 1992) lo que ha sido relacionado positivamente con la respuesta superovulatoria (Grasso y otros, 1989b; Romero y otros, 1991; Kawamata, 1994; Kohram y otros, 1995). En coincidencia con lo anterior,

Monniaux y otros (1984), han informado que folículos mayores de 1,7 mm de diámetro son movilizados con destino a ovulación o luteinización luego de realizar un tratamiento con eCG. Esto significa que a una mayor población de estos folículos, mayores serían las probabilidades de obtener una mejor respuesta superovulatoria.

La relación planteada entre la secuencia de fases foliculares y la respuesta superovulatoria explica los efectos diferenciales que se han obtenido al tratar animales en diferentes etapas del ciclo estral (Lindsell y otros, 1986). Estos autores observaron una menor respuesta en animales tratados en el día 3 comparado con el día 9; momento en el cual es altamente probable la ausencia de un folículo dominante en crecimiento.

Lo descrito precedentemente explica por qué los tratamientos son iniciados principalmente entre el día 8 y el 12 inclusive del ciclo estral (Kohram y otros, 1995). En este período existe una mayor probabilidad de que el folículo dominante no se encuentre en fase de crecimiento, facilitando así el desarrollo de los folículos pequeños.

En función de la revisión bibliográfica realizada surgen distintos protocolos de trabajo, para generar nuevos tratamientos de estimulación ovárica que permitan simplificar los tratamientos utilizados hasta el presente y/o disminuir la variabilidad en la respuesta superovulatoria. Entre estos se encuentran:

- a) La administración de la dosis total de FSH-P en un medio de liberación lenta que permita reducir la frecuencia de aplicaciones a una sola, sin afectar la respuesta al tratamiento.
- b) La asociación de la eCG con la FSH-P, en dosis menores a las utilizadas en forma separada, con la finalidad de evitar el excesivo crecimiento folicular estimulado por la primera de ellas. De esta forma se obtendría una respuesta superovulatoria equivalente a la del tratamiento con FSH-P en un esquema de múltiples inyecciones pero con la ventaja de poder efectuar el tratamiento una sola vez.
- c) La anulación de la dominancia folicular, aumentando los niveles plasmáticos de progesterona por medio de la administración exógena de dicha hormona. Esto permitirá generar un ambiente ovárico más favorable para obtener una adecuada respuesta a un tratamiento de estimulación ovárica.

III. Trabajos experimentales

1. Uso de FSH-P y eCG

1.1. El uso de FSH-P en dosis única o de FSH-P en dosis reducidas combinadas con eCG como forma de modificar la respuesta superovulatoria

1.1.1. Introducción

Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de diseñar un tratamiento que facilite la aplicación de FSH disminuyendo el estrés provocado por el movimiento de los animales con resultados variables (García y otros, 1982; Warfield y otros, 1986; Donaldson, 1991). Una de las formas intentadas fue la disolución de la FSH-P en un medio que permitiese su liberación lenta, en cantidades adecuadas, para obtener una buena estimulación ovárica. Yamamoto y otros (1994) utilizaron FSH-P disuelta en un polímero de alto peso molecular (polivinilpirrolidona, PVP) al 30%, con resultados alentadores. Este hecho abre las puertas para el estudio del uso de una sola inyección de FSH-P y la posibilidad de utilizarla como un tratamiento de rutina en nuestro medio.

Las dosis empleadas de eCG (2000-6000 U.I.; Mapletoft, 1980; Monniaux y Saumande, 1983; Zeitoun y otros, 1988; Springmann y otros, 1986; Callesen y otros, 1992) como asimismo su prolongada vida media (Murphy y Martinuk, 1991; Yadav y otros, 1986) hacen que el período de estimulación sobre el crecimiento folicular sea prolongado. Esto se traduce en un número de folículos grandes no ovulados en el momento en que se realiza la recolección de embriones, 7 u 8 días después de finalizado el tratamiento (Springmann y otros, 1986; Yadav y otros, 1986). Esto se confirma por el trabajo realizado por Zeitoun y otros (1988) quienes observaron que a medida que se aumenta la dosis de eCG se incrementa el número de folículos iguales o mayores a 10 mm y disminuye el porcentaje de embriones transferibles.

De acuerdo con lo descrito precedentemente es posible que una disminución de las dosis de eCG utilizada y su combinación con FSH-P en dosis única para fortalecer el estímulo ovárico constituya una alternativa viable en la generación de un nuevo tratamiento superovulatorio.

Por último, algunos estudios han determinado que tanto la presencia de un folículo dominante (Grasso y otros, 1989a; Guilbault y otros, 1991; Bungartz y Niemann, 1994) como el nivel de progesterona en el momento de iniciar un tratamiento de estimulación ovárica (Callensen y otros, 1988; Goto y otros, 1987, 1988) afectan la respuesta al mismo. Por lo tanto se considera de interés contemplar estos parámetros en el estudio de nuevos tratamientos superovulatorios con el fin de analizar la respuesta a los mismos.

1.1.2. Objetivos

- Estudiar el efecto de la administración de FSH-P vehiculizada en un medio de liberación lenta, en una sola dosis, sobre la respuesta superovulatoria.
- Estudiar el efecto de la combinación de dosis reducidas de FSH-P y de eCG administradas en un mismo momento sobre la respuesta superovulatoria.
- Estudiar el efecto de la presencia de un folículo dominante (en fases de crecimiento, de meseta o de regresión) al momento de iniciar un tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo.
- Estudiar el efecto del nivel de progesterona plasmática al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo.

1.1.3. Hipótesis

- La administración de FSH-P vehiculizada en un medio de liberación lenta, aplicada en una sola dosis, provoca una respuesta superovulatoria igual al tratamiento convencional de FSH-P en varias aplicaciones.
- La administración combinada de dosis reducidas de FSH-P y de eCG, inyectadas en una única oportunidad, provoca una respuesta superovulatoria igual al tratamiento convencional de FSH-P en varias aplicaciones.
- La presencia de un folículo dominante en crecimiento al inicio de un tratamiento de estimulación ovárica afecta negativamente la respuesta al mismo.
- El nivel de progesterona al momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica se relaciona con la respuesta al mismo.

1.1.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El ensayo se realizó en la Reserva 7 perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Balcarce.

Nueve vacas y 9 vaquillonas Aberdeen Angus, agrupadas dentro de cada categoría en tres grupos de tres animales cada uno respectivamente, fueron asignados aleatoriamente dentro de cada grupo, en un diseño "Change-over Latin square" a la siguiente secuencia de tres tratamientos: ABC, BCA y CAB, donde A es el tratamiento Control (FSH-P), B es el

tratamiento FSH-P PVP y C es el tratamiento FSH-P + eCG. Para realizar la aleatorización se tuvo en cuenta la categoría a la que pertenecía el animal.

- ◆ Tratamiento Control (FSH-P): El tratamiento de estimulación ovárica se realizó con un extracto purificado comercial de pituitarias porcinas (FSH-P™ Schering-Plough) con una dosis total de 30 y 34 mg Armour para vaquillonas y vacas respectivamente. El tratamiento fue administrado cada 12 hs (mañana y tarde) durante 4 días, en dosis decrecientes (5,5/5,5; 4,5/4,5; 3,0/3,0; 2,0/2,0 mg en vaquillonas y 6,0/6,0; 5,0/5,0; 3,5/3,5; 2,5/2,5 mg en vacas). A las 48 y 60 horas de comenzado el tratamiento se administraron respectivamente 500 µg y 250 µg de cloprostenol (CX0.1®, López & Villanueva).
- ◆ Tratamiento FSH-P PVP: Idem al anterior pero la dosis total de FSH-P (30 o 34 mg Armour, para vaquillonas o vacas) fue administrada en una sola inyección intramuscular. En este grupo, la FSH-P fue diluida en una solución al 30% de polivinilpirrolidona según lo descrito por Yamamoto y otros (1994). A las 48 y 60 horas de inyectada la FSH-P se administraron respectivamente 500 µg y 250 µg de cloprostenol (CX0.1®, López & Villanueva).
- ◆ Tratamiento FSH-P+eCG: Inyección simultánea de 5 o 6 mg (Vaquillonas o vacas) de FSH-P intramuscular con una inyección subcutánea de 1000 UI de eCG (Novormon®, Sintex) + 10 mg de FSH-P (Vaquillonas) o 1250 UI de eCG + 11 mg de FSH-P (vacas).

En los tres tratamientos la estimulación ovárica comenzó el día $10,4 \pm 0,2$ ($x \pm ee$) del ciclo estral. El ciclo estral de los animales fue sincronizado mediante el uso de un análogo sintético de la PGF 2α (500 mcg de cloprostenol, CX0.1®, López & Villanueva), en un esquema de dos inyecciones separadas por 13 días.

Los animales tuvieron una condición corporal al inicio de los tratamientos de $7,2 \pm 0,1$ ($x \pm ee$), basado en una escala de 1 a 9 (1: extremadamente flaca y 9 excesivamente gorda; Richards y otros, 1986).

B. Detección de celos y servicios

La detección de celos se realizó por observación visual, 2 veces por día, con una hora de duración en cada turno luego de finalizado el tratamiento de sincronización de celos. Esta frecuencia aumentó a tres veces por día luego de realizado el tratamiento superovulatorio. Se consideró animal en celo aquel que permaneció inmóvil al ser montado por otro.

El servicio se realizó mediante Inseminación Artificial (I.A.), utilizando semen congelado en pastillas provenientes de un toro con fertilidad probada. Las inseminaciones fueron realizadas por el mismo operador a las 12 y 24 horas de detectado el animal en celo.

C. Respuesta superovulatoria

Se consideró que el animal respondió al tratamiento superovulatorio cuando presentó más de dos cuerpos lúteos (determinado por ultrasonografía) al momento de la recolección de embriones.

D. Recolección y evaluación de embriones

La recolección de embriones se realizó el día 7 u 8 post celo, utilizando el método no quirúrgico descrito por Palma (1993a).

La evaluación morfológica de los embriones se realizó bajo lupa estereoscópica, según la clasificación descrita por Palma (1993b), en 4 grados: Excelente (GI), bueno (GII), regular (GIII) y malo (GIV) y ovocito sin fertilizar.

E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal

Los estudios ecográficos se realizaron con un ecógrafo Sono Ace 1500® (Ekhoson S.A.), modo-B, tiempo real, equipado con un transductor convexo transvaginal de 6.5 Mhz.

En cada ecografía, cada uno de los ovarios fue revisado varias veces en al menos 2 planos y se midió el folículo de mayor tamaño. Se registró una sola medida cuando el folículo era esférico y el promedio de 2 diámetros perpendiculares, cuando no lo era.

Las ecografías se realizaron el día -2 (día 0: inicio del tratamiento superovulatorio), el día 0 y en el momento de la recolección de embriones.

Las dos primeras observaciones ecográficas fueron realizadas para determinar las características del o los folículos existentes en el momento de iniciar el tratamiento superovulatorio: folículo dominante en fase de crecimiento (> 1 mm de diferencia entre las dos observaciones), en meseta (sin diferencias) o en regresión (< 1 mm de diferencia). La última observación ecográfica permitió evaluar la respuesta superovulatoria determinando el número de folículos ≥ 10 mm de diámetro y el de cuerpos lúteos.

Los muestreos de sangre se realizaron en todos los animales el día de inicio del tratamiento superovulatorio y, en los animales que no manifestaron celo, en el momento del celo esperado. Las muestras se tomaron por punción yugular, colocándolas en tubos heparinizados, se las centrifugó inmediatamente de extraídas y el plasma sobrenadante se conservó a -20°C hasta el momento en que se determinó la concentración de progesterona. Cuando la muestra de sangre coincidió con el estudio ecográfico, esta fue tomada en primer lugar.

La medición de progesterona se realizó por radioinmunoanálisis utilizando el Kit comercial ImmunoChemTM provisto por ICN Pharmaceuticals, Inc. El trazador radiactivo utilizado fue ^{125}I , con una sensibilidad de 0,15 ng/ml y coeficientes de variación inter e intraensayo, en niveles equivalentes a una fase luteal, de 9,1% y 5,9% respectivamente.

F. Nivel de progesterona y respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica

Para estudiar el efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo, los animales fueron clasificados según el nivel de progesterona en dicho momento en Grupo A, cuando el nivel fue ≥ 5 ng/ml al día 0 y Grupo B, cuando los valores fueron inferiores al mencionado nivel. El nivel de progesterona fue elegido basado en el trabajo Kukulác y otros (1991), quienes observaron que a partir de 5 ng/ml al inicio del tratamiento superovulatorio se obtenía una mayor respuesta superovulatoria.

G. Análisis estadístico

1. Se estudió el efecto de los tratamientos sobre:

- ◆ Porcentaje de animales que respondieron al tratamiento superovulatorio.
- ◆ Porcentaje de animales en celo post tratamiento.
- ◆ Intervalo prostaglandina-celo. Para analizar este parámetro los animales fueron agrupados teniendo en cuenta si respondieron o no al tratamiento superovulatorio.
- ◆ Número de cuerpo lúteos (CL).
- ◆ Número de folículos ≥ 10 mm.
- ◆ Número de embriones totales (ET): ovocitos + embriones recolectados.
- ◆ Número de embriones transferibles (Etrans: GI, GII y GIII).
- ◆ Número de embriones congelables (Econg: GI y GII).
- ◆ Número de embriones degenerados.
- ◆ Número de ovocitos sin fertilizar.
- ◆ Porcentaje de embriones recolectados con relación al número de CL (ET/CL*100)
- ◆ Porcentaje de embriones transferibles con respecto a los totales (Etrans/ET*100)

- ◆ Porcentaje de embriones congelables con respecto a los totales ($E_{cong}/ET*100$)
- 2. El efecto de la presencia de un folículo dominante en crecimiento, en meseta o en regresión sobre el número de cuerpo lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y de ovocitos sin fertilizar.
- 3. El efecto del nivel de progesterona en el momento de aplicar los tratamientos superovulatorios sobre el número de cuerpo lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y de ovocitos sin fertilizar.

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron utilizando, en el caso de las variables continuas el procedimiento GLM y en el caso de las variables discretas el procedimiento CATMOD; ambos pertenecientes al paquete estadístico SAS (1989).

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} : \mu + \theta_i + D_{(ij)} + \delta_{(ij)k} + \rho_{(ij)l} + \tau_{(ij)m} + \tau'_{m'} + \gamma_{(ij)km} + E_{(ijkl)}$$

Y_{ijklm} : Variable respuesta perteneciente al i ésimo cuadrado, al j otaésimo individuo, en la k ésimo categoría, al l ésimo período y al m ésimo tratamiento superovulatorio.

μ : Media general.

θ_i : Efecto del i ésimo cuadrado.

$D_{(ij)}$: Efecto de j otaésimo individuo anidado dentro del i ésimo cuadrado.

$\delta_{(ij)k}$: Efecto de la k ésimo categoría anidada dentro del i ésimo cuadrado.

$\rho_{(ij)l}$: Efecto del l ésimo período anidado dentro del i ésimo cuadrado.

$\tau_{(ij)m}$: Efecto del m ésimo tratamiento anidado dentro del i ésimo cuadrado.

$\gamma_{(ij)km}$: Efecto de la interacción de la k ésima categoría con m ésimo tratamiento anidado dentro del i ésimo cuadrado.

$\tau'_{m'}$: Efecto residual del m' tratamiento aplicado en el período previo.

$E_{(ijkl)}$: El error del modelo.

Para estudiar el efecto del estadio del folículo dominante (en fases de crecimiento, meseta o en regresión) o el nivel de progesterona al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio se realizó un ANOVA, considerando dichos efectos en el modelo de análisis.

Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante el Test de Tukey. Las diferencias significativas se establecieron con un $\alpha=0,05$.

El número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar fue transformado utilizando la ecuación $y=\log(x+1)$.

Los porcentajes de recuperación de embriones, de embriones transferibles y de embriones congelables fueron transformados mediante la ecuación $y = \arcseno \sqrt{x}$, analizándose los por ANOVA (Sokal y Rolft, 1981).

Todos los valores se expresan como $\bar{x} \pm e.e.$

1.1.5. Resultados

En ninguna de las variables estudiadas se observó un efecto de la categoría por lo que los resultados se analizan y presentan agrupados.

A. Respuesta superovulatoria y celo post tratamiento

El grupo de animales tratados con FSH-P disuelta en PVP presentó la menor respuesta superovulatoria ($P < 0,05$) y el menor porcentaje de animales en celo post tratamiento ($P < 0,01$; Cuadro N°1). En ambos parámetros, los grupos FSH-P y FSH-P + eCG tuvieron un comportamiento similar ($P > 0,05$; Cuadro N°1).

Cuadro N°1. Porcentajes de animales con respuesta y de celo en diferentes tratamientos de estimulación ovárica.

Tratamientos	n	Porcentaje de respuesta	Porcentaje de celo
FSH-P ¹	18	88,8 ^c	100 ^c
FSH-P PVP ²	18	27,8 ^d	33,3 ^d
FSH-P+eCG ³	18	72,2 ^c	100 ^c

Referencias: ¹30-34 mg de FSH-P, según se tratara de vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en dosis decrecientes por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días.

²30-34 mg de FSH-P, según sean vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en una única aplicación, por vía intramuscular, disuelto en polivinil pirrolidona.

³5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$).

El 25% de los animales que no manifestaron celo en el momento esperado, tuvieron niveles plasmáticos de progesterona > 1 ng/ml.

B. Intervalo prostaglandina-celo

Se observó un efecto significativo de la interacción tratamiento x respuesta superovulatoria ($P < 0,01$) sobre el intervalo prostaglandina-celo. En consecuencia, la variable se analizó dentro de cada tratamiento.

En el tratamiento FSH-P+eCG se observó un efecto de la respuesta superovulatoria sobre el intervalo prostaglandina-celo ($P < 0,01$; Cuadro N°2).

Cuadro N°2. Intervalo prostaglandina-celo en cada tratamiento de estimulación ovárica según haya habido (CR) o no respuesta (SR) ($\bar{x} \pm ee$).

Tratamientos	Respuesta superovulatoria	
	CR	SR
FSH-P ¹	45,4±2,1 ^a (16/18)	51±3 ^a (2/18)
FSH-P PVP ²	50,4±11 ^a (5/18)	36 ^a (1/18)
FSH-P+eCG ^{3,4}	46,2±2,6 ^a (13/18)	75,6±5,9 ^b (5/18)

Referencias: CR: Con respuesta, SR: sin respuesta. El valor entre paréntesis corresponde al número de animales que manifestaron celo post tratamiento.

^{1,2,3}Ver cuadro N°1.

⁴Efecto respuesta superovulatoria: Solo significativo en el tratamiento FSH-P+eCG ($P < 0,01$).

^{a,b}Letras distintas en una fila difieren estadísticamente ($P < 0,01$).

C. Cuerpos lúteos y folículos

En el grupo FSH-P PVP se observó el menor número promedio de cuerpos lúteos ($P < 0,01$); los otros tratamientos no difirieron entre sí ($P > 0,05$; Cuadro N°3).

Cuadro N°3. Número de cuerpos lúteos en los diferentes tratamientos superovulatorios ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamientos	Número de cuerpos lúteos
FSH-P ¹	7,4±0,7 ^a
FSH-P PVP ²	2,0±0,4 ^b
FSH-P+eCG ³	5,9±0,8 ^a

Referencias: ^{1,2,3}Ver cuadro N°1.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

No se observó efecto de los tratamientos sobre la presencia de folículos ≥ 10 mm de diámetro en el momento de recolectar los embriones ($1,5 \pm 0,3$; $P > 0,05$).

D. Embriones y ovocitos sin fertilizar

El tratamiento FSH-P PVP produjo el menor número de embriones totales, transferibles y congelables ($P < 0,01$); los tratamientos FSH-P y FSH-P+eCG no difirieron entre sí ($P > 0,05$; Cuadro N°4).

Cuadro N°4. Producción de embriones y ovocitos en los diferentes tratamientos de estimulación ovárica ($\bar{x} \pm e.e.$)

Tratamientos	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
FSH-P ¹	5,5±0,5 ^a	4,4±0,4 ^a	3,2±0,5 ^a	0,9±0,2 ^a	0,3±0,1 ^a
FSH-P PVP ²	0,7±0,4 ^b	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b	0,1±0,1 ^a	0,3±0,2 ^a
FSH-P+eCG ³	4,5±0,7 ^a	3,8±0,6 ^a	2,6±0,4 ^a	0,6±0,2 ^a	0,1±0,1 ^a

Referencias: ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.

^{1,2,3}Ver cuadro N°1.

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

Se observó un efecto significativo del tratamiento sobre el porcentaje de embriones recolectados en relación con los cuerpos lúteos presentes ($P < 0,05$). Por el contrario, no se observaron diferencias en los porcentajes de embriones transferibles o congelables en relación con los totales (Cuadro N°5). En el grupo FSH-P PVP se determinó un menor porcentaje de embriones recolectados comparado con el grupo FSH-P ($P < 0,01$).

Cuadro N°5. Porcentaje de embriones recolectados, embriones transferibles y congelables según tratamiento utilizado ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamientos	Porcentaje de Embriones Recolectados
FSH-P ¹	76,5±6,6 ^b
FSH-P PVP ²	18,8±12,2 ^a
FSH-P+eCG ³	65,6±11,3 ^{ab}
Porcentaje de Embriones Transferibles	
FSH-P ¹	80,0±4,3
FSH-P PVP ²	48,0±16,7
FSH-P+eCG ³	80,0±8,6
Porcentaje de Embriones Congelables	
FSH-P ¹	55,0±8,0
FSH-P PVP ²	34,0±14,1
FSH-P+eCG ³	57,2±7,4

Referencias: ^{1,2,3}Ver cuadro N°1.

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

E. Relación entre el estadio del folículo dominante en el momento de iniciar un tratamiento superovulatorio y el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y ovocitos sin fertilizar

La representación de los diferentes estadios del folículo dominante (crecimiento, meseta y regresión) fue similar entre tratamientos ($P>0,05$, Cuadro N°6).

Cuadro N°6. Porcentaje de los diferentes estadios del folículo dominante al momento de comenzar la estimulación ovárica en los diferentes tratamientos superovulatorios.

Tratamientos	Estado del folículo dominante		
	Crecimiento	Meseta	Regresión
FSH-P ¹	17,5 ^a (3/18)	50,0 ^a (9/18)	33,3 ^a (6/18)
FSH-P PVP ²	17,5 ^a (3/18)	33,3 ^a (6/18)	50,0 ^a (9/18)
FSH-P+eCG ³	33,3 ^a (6/18)	38,9 ^a (7/18)	27,8 ^a (5/18)

Referencias: ^{1,2,3}Ver cuadro N°1.

^aValores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente ($P>0,05$)

Se observó un efecto significativo de la interacción tratamiento por el estadio del folículo dominante al momento de realizar la superovulación, sobre la producción de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables ($P<0,05$). No hubo efecto sobre el número de embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar ($P>0,05$). La presencia de un folículo dominante en crecimiento al momento de comenzar el tratamiento de estimulación ovárica provocó una disminución en la respuesta al mismo en los grupos FSH-P y FSH-P+eCG comparado con aquellos animales que tuvieron un folículo dominante en fases de meseta o regresión ($P<0,05$). La presencia de estos dos estadios no afectó la respuesta superovulatoria ($P>0,05$; Cuadro N°7). En el grupo FSH-P PVP no se observó efecto del estadio del folículo dominante.

Cuadro N°7. Número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y ovocitos sin fertilizar según el estado del folículo dominante al momento de realizar el tratamiento superovulatorio en los grupos FSH-P y FSH-P+eCG ($\bar{x}\pm e.e.$).

Tratamiento	FD	CL	ET	Etrans	ECong	Edeg	Ovo
FSH-P ¹ y FSH-P + eCG ²	C	2±0,7 ^b	1,2±1,1 ^b	0,8±1 ^b	0,4±0,5 ^b	0,3±0,7 ^a	0,1±0,3 ^a
	M+R	8,3±0,3 ^a	6,3±0,3 ^a	5,2±0,2 ^a	3,7±0,3 ^a	0,9±0,1 ^a	0,2±0,1 ^a

Referencias: FD: Estadio del folículo dominante. C: Crecimiento, M: Meseta, R: Regresión.

CL: Cuerpo lúteo. ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.

^{1,2}Ver cuadro N°1.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren ($P<0,01$).

F. Relación entre el nivel de progesterona plasmática en el día de inicio del tratamiento superovulatorio y el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y ovocitos sin fertilizar

En función de no existir diferencias significativas entre los tratamientos FSH-P y FSH-P+eCG en la respuesta superovulatoria, se agruparon los resultados de ambos tratamientos.

En los animales pertenecientes a los grupos FSH-P y FSH-P+eCG que tuvieron un nivel de progesterona inferior a 5 ng/ml de plasma en el día de inicio del tratamiento superovulatorio, se observó una menor producción de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles y congelables que aquellos con un nivel igual o mayor ($P < 0,01$; Cuadro N°8).

Cuadro N°8. Número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y ovocitos sin fertilizar según el nivel de progesterona plasmática al día de inicio de los tratamientos superovulatorios ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamientos	P4 (ng/ml)	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
FSH-P ¹ y FSH-P + eCG ²	<5	2,9±0,8 ^a	1,7±0,6 ^a	1,2±0,5 ^a	0,7±0,3 ^a	0,2±0,2 ^a	0,2±0,1 ^a
	≥5	8±0,4 ^b	6,1±0,3 ^b	5±0,3 ^b	3,6±0,3 ^b	0,9±0,1 ^a	0,2±0,1 ^a

Referencias: CL: Cuerpo lúteo. ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.

^{1,2,3} Ver cuadro N°1.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

En el grupo FSH-P PVP, no se observó efecto del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria ($P > 0,05$).

1.1.6. Discusión

La comparación de los diferentes tratamientos utilizados, demostró que en el grupo FSH-P PVP la respuesta superovulatoria observada fue baja e inferior a la de los otros grupos experimentales. El número de cuerpo lúteo y embriones fue similar al obtenido con una sola administración, intramuscular, de FSH-P disuelta en un medio de liberación rápida (solución salina -grupo control-, Yamamoto y otros, 1994). Esta respuesta también fue observada cuando la administración de FSH-P/solución salina se realizó vía subcutánea (Takedomi y otros, 1993). Estos autores determinaron que el nivel plasmático de FSH a las 48 horas de inyectada dicha hormona fue similar a los niveles pretratamiento, hecho que no ocurrió cuando utilizaron un medio de liberación lenta. En consecuencia, se puede plantear la hipótesis que la preparación de FSH-P disuelta en polivinil pirrolidona utilizada en el presente trabajo, tuvo una absorción

similar a la disuelta en solución salina (medio de liberación rápida), no comportándose de acuerdo a lo esperado (medio de liberación lenta). Por lo tanto, con una sola inyección no se lograría que los animales tuvieran un nivel sostenido de FSH para obtener una respuesta superovulatoria acorde o superior a la obtenida en el grupo Control.

La FSH-P PVP se preparó y administró de acuerdo a lo indicado por Yamamoto y otros (1994) para el grupo tratado (FSH-P en solución de polivinil pirrolidona), quienes obtuvieron una respuesta superovulatoria caracterizada por 12,3 y 7,2 cuerpos lúteos y embriones transferibles respectivamente. Además, la PVP utilizada fue la K29-32 con un peso molecular de 40.000, similar a la utilizada por los mencionados investigadores. Estos hechos descartan al tipo de PVP utilizada, la forma en que se preparó y administró la FSH-P como causa explicativa de los resultados obtenidos.

Por otro lado, Susuki y otros (1994) observaron una baja respuesta superovulatoria en vaquillonas tratadas con 30 mg de FSH-P en PVP (3,8 cuerpos lúteos y 2,8 embriones transferibles), atribuyendo esto a un efecto de sobre-estimulación ovárica. Este hecho se reflejó en un mayor número de folículos ≥ 10 mm de diámetro en los animales con menor respuesta superovulatoria (5,2 y 1,8 a 2 folículos en animales con baja o alta respuesta superovulatoria respectivamente). En el presente trabajo el número de folículos mayores a 10 mm fue similar en los diferentes grupos experimentales (1,2 a 2 folículos), lo que permite descartar a esta hipótesis como causal de la baja respuesta superovulatoria observada en el grupo FSH-P PVP.

En conclusión, la FSH-P disuelta en PVP tal cual fue administrada en el presente trabajo no permite generar una adecuada respuesta superovulatoria en animales Aberdeen Angus, en contraposición a lo informado Yamamoto y otros (1994) en vacas Holstein.

La administración de dosis reducidas de eCG (1000 – 1250 UI) y su combinación con bajas dosis de FSH-P (15-17 mg Armour), permitió obtener una respuesta superovulatoria equivalente a la observada en el grupo Control (FSH-P). La presencia de folículos \geq a 10 mm al momento del "flushing" no difirió entre grupos, con lo cual se evitó el efecto perjudicial que tienen dosis mayores de eCG (Mikel-Jenson y otros, 1982; Betteridge y otros 1981/82; Moor y otros, 1984).

Bono y otros (1991), combinaron dosis reducidas de eCG (1000 UI) con hMG (297 UI de FSH y 297 UI de LH), obteniendo un mayor porcentaje de embriones transferibles que lo observado en las vacas tratadas con 3000 UI de eCG (86% vs 46% respectivamente), coincidiendo dicho porcentaje con el obtenido en el presente trabajo (89%) en el grupo FSH-P+eCG.

Con respecto al porcentaje de animales que respondieron al tratamiento superovulatorio, fue similar entre los grupos FSH-P y FSH-P+eCG (72% - 82%), y

coinciden con el informado por diversos investigadores (72,6-82%; Lindsell y otros, 1986; Sanchez-Garcia y otros, 1992-; Alvarez y otros, 1995).

En estos mismos tratamientos, el número de cuerpo lúteos (5,9-7,2), embriones totales (4,5-5,5), transferibles (3,8-4,4) y congelables (2,6-3,2) estuvo en la escala inferior del rango informado por diversos autores (CL: 4,2-31, Pawlyshyn y otros, 1986; Sanchez Garcia y otros, 1992; Ambrose y Rajamahendran; 1995; ET: 3,2 – 22,8, Prado Delgado y otros, 1984; Mc Gowan y otros, 1983; Mapletoft y otros, 1990; Etrans: 0-11, Sanchez Garcia y otros, 1992; Ortuno y otros, 1985; Mc Gowan y otros, 1983; Nigro y otros, 1999; Econg: 3-6,5, Boland y otros, 1991; Staigmiller y otros, 1992; Kelly y otros, 1995; Walsh y otros, 1993).

El porcentaje de recolección de embriones en los grupos FSH-P y FSH-P+eCG (65,6-76,5%) es coincidente con lo informado Wubishet y otros (1986); Sanchez Garcia y otros (1992) y Alcivar y otros (1984). Contrariamente, en el caso del grupo FSH-P PVP el resultado fue inferior al citado en la bibliografía (Wubishet y otros, 1986; Sanchez Garcia y otros, 1992 y Alcivar y otros, 1984), no encontrándose una explicación clara al respecto.

El porcentaje de embriones transferibles y congelables no difirió entre grupos y se encuentra en el rango citado en la literatura (Mapletoft y otros, 1988a; Lopez Gatiús, 1988; Blanchard y otros, 1990; Petr y otros, 1990; Staigmiller y otros, 1992; Kuehner y otros, 1993; Garcia Bojalil y otros, 1994; Gong y otros, 1995; Larocca y otros, 1995; Caccia y otros, 1999).

Existen numerosos factores que afectan la respuesta superovulatoria (Kafi y McGowan, 1997) y explican la variabilidad de los resultados obtenidos por distintos investigadores. En el presente trabajo, las vacas que no respondieron al tratamiento superovulatorio tuvieron un folículo dominante en crecimiento, por lo que la respuesta al mismo fue severamente deprimida, tal cual fue observado por diversos investigadores (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995). Estos resultados dejaron claramente demostrado que el estado ovárico al momento de iniciar el tratamiento de estimulación fue la principal causa de la baja respuesta observada en número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables.

El nivel de progesterona plasmática también explicaría una parte de la variabilidad en la respuesta al tratamiento superovulatorio ya que se encontró relacionado positivamente con la respuesta al mismo. Esto es coincidente con lo observado por diversos investigadores (Callensen y otros, 1988; Goto y otros, 1987, 1988; Herrier y otros, 1990; Yadav y otros, 1986; Nakajima y otros, 1992). No obstante, otros no han encontrado tal relación (Saumande, 1980; Tamboura y otros, 1985; Walton y Stubbing, 1986).

Los animales que tuvieron un nivel de progesterona \geq a 5 ng/ml al inicio del tratamiento superovulatorio tuvieron en su mayoría un folículo dominante en fases de meseta o regresión (86,7%). Por el contrario, los animales con una concentración inferior

presentaron en un 83,3% un folículo dominante en fase de crecimiento. Esto plantea que gran parte de las diferencias observadas en la respuesta superovulatoria entre los niveles de progesterona estudiados se deberían al estadio del folículo dominante. Diferencias en esta característica como en las sensibilidades de las metodologías utilizadas para realizar la medición hormonal podrían explicar las divergencias observadas entre investigadores.

Con respecto al tratamiento FSH-P PVP, no se observaron efectos del estadio del folículo dominante y del nivel de progesterona debido a que en estos animales no existió respuesta alguna a la estimulación ovárica.

La ausencia de celo post tratamiento superovulatorio en el grupo FSH-P PVP (25% de los animales) se debe a que estos tuvieron niveles de progesterona mayores a 1 ng/ml al momento del celo esperado, lo que plantea ausencia de luteólisis. Una posible explicación es que la dosis total de FSH-P al ser utilizada en una única aplicación y en un medio que no se habría comportado como de liberación lenta, haya provocado la ovulación del folículo dominante presente al momento de aplicar el tratamiento. La causa de este hecho sería el contenido de LH presente en el preparado hormonal. En consecuencia, al momento de inyectar el agente luteolítico, el cuerpo lúteo formado recientemente no sería sensible al mismo (Fortin, 1989). Ovulaciones prematuras han sido informadas por Callensen y otros (1987) en animales estimulados con gonadotrofinas, lo que daría sustento a lo previamente planteado.

En los animales que tuvieron un nivel de progesterona menor a 1 ng/ml al momento del celo esperado, resulta difícil encontrar una explicación a la ausencia del mismo dado que la metodología empleada y el momento en que se hizo la detección fueron los mismos en todos los grupos y solamente en el grupo FSH-P PVP se observaron animales sin manifestación de celo.

Por último, el intervalo prostaglandina-celo en los animales superovulados se encuentra en el rango citado en la bibliografía (Canseco y otros, 1992; Mc Gowan y otros, 1985; Lindsell y otros, 1986; Lopez Gatus y otros, 1988; Larocca y otros, 1999); observándose que los animales que no tuvieron respuesta superovulatoria con el tratamiento combinado FSH-P+eCG presentaron un intervalo mayor que el de los animales con respuesta. El mayor intervalo fue similar al observado en animales que no recibieron tratamiento de estimulación ovárica (Seidel y otros, 1978; citado por Canseco y otros, 1992).

1.1.7. Conclusiones

De los resultados analizados del presente trabajo se puede concluir que:

- El tratamiento de estimulación ovárica combinando dosis reducidas de FSH-P (subcutánea + intramuscular) y eCG (subcutánea), administrados en un mismo momento induce una respuesta superovulatoria similar a la que se obtiene con el tratamiento tradicional de FSH-P administrado durante 4 días en dosis decrecientes.
- La administración de FSH-P disuelta en polivinil pirrolidona, administrada en una sola dosis intramuscular, no induce respuesta superovulatoria. La ausencia de efectos estimulatorios se observan tanto en vacas como en vaquillonas.
- La respuesta superovulatoria a tratamientos con FSH-P o FSH-P+eCG es similar en vacas y vaquillonas.
- La presencia de un folículo dominante en crecimiento al momento de realizar un tratamiento de estimulación ovárica afecta negativamente la respuesta al mismo.
- El nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio se relaciona con la respuesta al mismo. Niveles iguales o mayores a 5 ng/ml de plasma coinciden con una mayor respuesta en cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables.

1.2. El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio

1.2.1. Introducción

En el experimento anterior se determinó que la asociación de dosis reducida de FSH-P y eCG, administradas en una única aplicación, provocaron una respuesta superovulatoria equivalente a la obtenida con el tratamiento convencional de FSH-P (dosis completa, fraccionada en múltiples aplicaciones). En consecuencia, se diseñó el presente trabajo para discriminar con mayor precisión si el efecto obtenido era producto de la asociación de ambas hormonas o de alguna de ellas en particular.

1.2.2. Objetivo

- Determinar la respuesta ovárica después de la aplicación de dosis reducidas de eCG administradas por vía subcutánea, de FSH-P aplicada por vía intramuscular y subcutánea, y de la combinación de ambas.

1.2.3. Hipótesis

- La respuesta superovulatoria que se obtiene después de administrar la asociación de dosis reducidas de eCG y de FSH-P se debe al efecto combinado de ambas gonatropinas y no a una de ellas en particular.

1.2.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El lugar es el indicado en la sección 1.1.4.A.

Se utilizaron 12 vaquillonas y 24 vacas con actividad sexual cíclica, distribuidas en según un diseño completamente aleatorizado en tres tratamientos de acuerdo con el tipo de estimulación ovárica realizada.

- ◆ $\frac{1}{2}$ FSH-P: 5 o 6 mg de FSH-P administrados vía intramuscular y 10 u 11 mg de FSH-P inyectados por vía subcutánea en vaquillonas y vacas respectivamente. En ambos casos en dosis única y simultánea.

- ◆ $\frac{1}{2}$ eCG: 1000 o 1250 UI de eCG administradas vía subcutánea en vaquillonas y vacas respectivamente.
- ◆ FSH-P+eCG: Combinación de los tratamientos hormonales de los grupos anteriores ($\frac{1}{2}$ FSH-P + $\frac{1}{2}$ eCG).

En el caso de las vaquillonas, las mismas fueron reutilizadas en una única oportunidad, luego de un periodo de espera superior a 6 meses, como para no tener efecto residual de los tratamientos anteriores según lo observado en el trabajo previo.

En los tres grupos el tratamiento superovulatorio se realizó a partir del día $10 \pm 0,1$ ($x \pm ee$) del ciclo estral. El mismo fue sincronizado según lo indicado en la sección 1.1.4.A.

La condición corporal de las hembras al inicio del tratamiento no difirió entre categorías, ni entre tratamientos ($6,9 \pm 0,1$; $x \pm ee$).

B. Detección de celos y servicios

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.B..

C. Respuesta superovulatoria

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.C.

D. Recolección y evaluación de embriones

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.D.

E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.E.

F. Nivel de progesterona y respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.F.

G. Análisis estadístico

Los parámetros estudiados como el procedimiento utilizado es el descrito en la sección 1.1.4.G. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ikl} : \mu + \delta_k + \tau_j + \gamma_{jk} + E_{(ijk)}$$

Y_{ikl} : Variable respuesta perteneciente al i ésimo individuo, a la k ésima categoría y al l ésimo tratamiento superovulatorio

μ : Media general.

δ_k : Efecto de la k ésima categoría.

τ_j : Efecto del j ésimo tratamiento superovulatorio.

γ_{jk} : Efecto de la interacción del j ésimo tratamiento superovulatorio con la k ésima categoría.

$E_{(ijk)}$: Error del modelo.

1.2.5. Resultados

En ninguna de las variables analizadas se observaron efectos de la categoría, ni de la interacción tratamiento por categoría ($P > 0,05$). En consecuencia, los resultados se presentan agrupando ambas categorías.

A. Respuesta superovulatoria y celo post tratamiento

El 100% de las hembras respondió al tratamiento FSH-P+eCG, difiriendo significativamente ($P < 0,01$) de los tratamientos que utilizaron una dosis reducida de FSH-P o eCG (Cuadro N°9).

Cuadro N°9. Respuesta superovulatoria después de diferentes tratamientos gonadotróficos.

Tratamientos	n	Porcentaje de respuesta
$\frac{1}{2}$ FSH-P ¹	16	6,25 ^a
$\frac{1}{2}$ eCG ²	16	25,0 ^a
FSH-P+eCG ³	16	100,0 ^b

Referencias:¹5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente.

²1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

³5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

El grupo de hembras tratadas con una dosis reducida de FSH-P tuvo el menor porcentaje de celo post tratamiento ($P < 0,01$); no existiendo diferencias entre los tratamientos eCG y FSH-P+eCG (25%, 75% y 100% respectivamente).

B. Intervalo prostaglandina-celo

Las hembras que respondieron a los tratamientos superovulatorios tuvieron un menor intervalo prostaglandina-celo que aquellas que no respondieron ($46,9 \pm 2,1$ y $85,6 \pm 7,8$ horas respectivamente; $P < 0,01$).

El intervalo prostaglandina-celo del grupo FSH-P+eCG ($46,9 \pm 2,1$ horas) resultó inferior al de los tratamientos $\frac{1}{2}$ FSH-P ($82,5 \pm 18,4$ horas; $P < 0,01$) y $\frac{1}{2}$ eCG ($70,5 \pm 7,5$ horas; $P < 0,05$).

C. Cuerpos lúteos y folículos

En el grupo FSH-P + eCG se observó el mayor número de cuerpos luteos ($P < 0,01$); los otros tratamientos no difirieron entre sí ($P > 0,05$, Cuadro N°10).

Cuadro N°10. Número de cuerpos lúteos después de diferentes tratamientos gonadotróficos ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamientos	Cuerpo lúteo
$\frac{1}{2}$ FSH-P ¹	$1,3 \pm 0,2^a$
$\frac{1}{2}$ eCG ²	$1,9 \pm 0,4^a$
FSH-P+eCG ³	$7,6 \pm 0,8^b$

Referencias: ^{1,2,3}Ver Cuadro N°9

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

El número de folículos ≥ 10 mm de diámetro presentes en el momento de realizar la colecta de embriones, fue similar entre tratamientos ($1,6 \pm 0,3$; $P > 0,05$).

D. Embriones y ovocitos sin fertilizar

En las hembras tratadas con FSH-P+eCG se obtuvo el mayor número de embriones totales, transferibles y congelables ($P < 0,01$) comparado con los tratamientos que utilizaron una dosis reducida de FSH-P o de eCG (Cuadro N°11). Este efecto también fue observado en el número de embriones degenerados y de ovocitos sin fertilizar ($P < 0,05$).

Cuadro N°11. Producción de embriones y ovocitos sin fertilizar en los diferentes tratamientos de estimulación ovárica ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamientos	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
$\frac{1}{2}$ FSH-P ¹	0,06±0,06 ^a	0,06±0,06 ^a	0,06±0,06 ^a	0,0±0,0 ^c	0,0±0,0 ^c
$\frac{1}{2}$ eCG ²	0,7±0,4 ^a	0,3±0,2 ^a	0,1±0,1 ^a	0,1±0,1 ^c	0,06±0,1 ^c
FSH-P+eCG ³	6,3±0,7 ^b	4,3±0,5 ^b	3±0,4 ^b	0,9±0,2 ^d	0,9±0,3 ^d

Referencias: ^{1,2,3} Ver Cuadro N°9

ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: a,b ($P < 0,01$) y c,d ($P < 0,05$).

Los porcentajes de embriones recolectados, de embriones transferibles y congelados se presentan solo en el tratamiento FSH-P+eCG, dado que en los otros tratamientos la mayoría de los animales no presentaron respuesta superovulatoria (Cuadro N°12).

Cuadro N°12. Porcentaje de embriones recolectados, transferibles y congelables en el tratamiento FSH-P + eCG¹ ($\bar{x} \pm e.e.$).

Porcentaje de Embriones Recolectados	84,1±4,5
Porcentaje de Embriones Transferibles	68,0±2,6
Porcentaje de Embriones congelables	45,9±4,7

Referencias: ¹ 5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

E. Relación entre el estadio del folículo dominante y el número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar

Al momento de comenzar los tratamientos de estimulación ovárica, hubo similar proporción de animales con los tres tipos de fases de folículo dominante (crecimiento, meseta o en regresión, Cuadro N°13).

Cuadro N°13. Proporción de los diferentes estadios del folículo dominante al momento de comenzar la estimulación ovárica en los diferentes grupos experimentales ($\bar{x}\pm e.e.$).

Tratamientos	Estadio del folículo dominante		
	Crecimiento	Meseta	Regresión
$\frac{1}{2}$ FSH-P ¹	43,8 (7/16)	31,3 (5/16)	25,0 (4/16)
$\frac{1}{2}$ eCG ²	43,8 (7/16)	31,3 (5/16)	25,0 (4/16)
FSH-P+eCG ³	50,0 (8/16)	25,0 (4/16)	25,0 (4/16)

Referencias: ^{1,2,3} Ver Cuadro N°9

Para el análisis del efecto del estadio del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria sólo se consideró al grupo FSH-P+eCG debido a que fue el único que respondió al tratamiento de estimulación ovárica.

Las hembras con un folículo dominante en fases de meseta o regresión al inicio del tratamiento superovulatorio, tuvieron la mayor respuesta en número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles y congelables en comparación con las hembras que tuvieron un folículo dominante en crecimiento (Cuadro N°14). Los dos primeros estadios no difirieron entre si ($P>0,05$).

Cuadro N°14. Efecto del estadio del folículo dominante al momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo ($\bar{x}\pm e.e.$).

FD	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
C	4,3±0,3 ^c	3,0±0,0 ^a	2,0±0,0 ^a	1,0±0,2 ^a	1,0±0,0	0,0
M+R	8,7±0,5 ^d	7,4±0,4 ^b	5,1±0,3 ^b	3,7±0,2 ^b	0,9±0,2	1,25±0,2

Referencias: FD: Estadio del folículo dominante. C: Crecimiento, M: Meseta, R: Regresión
 ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.
 Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.
 Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: a,b ($P<0,01$) y c,d ($P<0,05$).

F. Relación entre el nivel de progesterona plasmática en el día de inicio del tratamiento superovulatorio y respuesta ovárica al mismo

Solo se consideró al grupo FSH-P+eCG por ser el único que presentó respuesta superovulatoria.

Las hembras que tuvieron un nivel de progesterona plasmática ≥ 5 ng/ml al inicio del tratamiento de estimulación ovárica presentaron la mayor cantidad de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables ($P<0,01$; Cuadro N°15).

Cuadro N°15. Número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables y degenerados y ovocitos sin fertilizar según el nivel de progesterona plasmática al día de inicio del tratamiento superovulatorio

P4 (ng/ml)	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
<5	4,6±0,4 ^a	3,6±0,5 ^a	2,4±0,4 ^a	1,4±0,4 ^a	1,0±0,0	0,2±0,2
≥5	8,9±0,9 ^b	7,5±0,8 ^b	5,2±0,7 ^b	3,7±0,4 ^b	0,9±0,4	1,3±0,4

Referencias: ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar.

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

1.2.6. Discusión

El uso de dosis reducidas de FSH-P o de eCG no tuvo efecto estimulador, de acuerdo a la hipótesis planteada al diseñar el presente trabajo.

La reducción de la dosis de las gonadotropinas, administradas en un esquema de múltiples aplicaciones, no fue suficiente para obtener una buena respuesta superovulatoria (hMG: a un 25%, Mc Gowan y otros, 1985; Folltropin: a 5 mg Armour, Mapletoft y otros, 1988a; González y otros, 1990).

La dosis total de gonadotropinas, administrada por vía subcutánea en la paleta en una única vez, provocó una respuesta superovulatoria comparable a la observada después de la aplicación de múltiples inyecciones intramusculares (Bo y otros, 1991; Hockley y otros, 1992; Staigmiller y otros, 1992; Misra y otros, 1992; Kasiraj y otros, 1992; Schalleberger y otros, 1994). No obstante, otros autores han obtenido una respuesta menor (Kelly y otros, 1997; Walsh y otros, 1993), postulando que la concentración plasmática de FSH era inadecuada. Este hecho fue observado por Takedomi y otros (1993), quienes determinaron que los niveles de FSH a las 48 hs de administrada la gonadotropina, vía subcutánea, eran similares a las detectadas previo a la aplicación del tratamiento. En el presente trabajo, en el grupo ½ FSH-P además de utilizar una única aplicación, la dosis fue reducida por lo que se puede plantear que los niveles plasmáticos de FSH generados por el tratamiento no fueron suficientes para provocar una adecuada estimulación ovárica.

Con respecto a la eCG, las dosis utilizadas en vaquillonas y vacas (1000-1250 UI) no fueron suficientes para obtener un número de cuerpos lúteos y embriones similares a lo informado por diversos investigadores, quienes emplearon un rango de 2000 a 3000 UI (Wubishet y otros, 1986; Zeitun y otros, 1991; Boland y otros, 1991). Sin embargo, se trataba de un nivel hormonal similar al utilizado para producir mellizos (Anderson, 1982; Turman y otros, 1972).

En función de los resultados obtenidos en los grupos ½ FSH-P y ½ eCG, es posible afirmar que la respuesta observada en el grupo con la asociación de las dos

gonadotropinas (FSH-P+eCG) es el resultado del efecto combinado de ambas y no del efecto de una de ellas en particular.

El efecto de la presencia de un folículo dominante en crecimiento al inicio de un tratamiento de estimulación ovárica y del nivel de progesterona en dicho momento es coincidente con lo observado y discutido en la sección 1.1.6.

En los animales que no manifestaron celo después del tratamiento, el nivel de progesterona en el momento esperado del celo fue menor a 1 ng/ml de plasma, descartándose una falla en el mecanismo de luteólisis. En consecuencia y dado que los animales ovularon, el celo no fue observado. Es difícil encontrar una explicación al respecto dado que la metodología de detección y el momento fueron los mismos en los diferentes grupos experimentales.

Por último, el intervalo prostaglandina-celo en los animales superovulados se encuentra en el rango citado en la bibliografía (Canseco y otros, 1982; Mac Gowan y otros, 1985; Lindsell y otros, 1986; Lopez Gatus y otros, 1988; Larocca y otros, 1999). Los animales que no tuvieron respuesta superovulatoria presentaron un intervalo mayor, comportándose como si no hubiera recibido tratamiento de estimulación ovárica (Seidel y otros, 1978; citado por Canseco y otros, 1982).

1.2.7. Conclusiones

- Las dosis reducidas de FSH-P (5 o 6 mg en forma intramuscular y 10 u 11 mg vía subcutánea, según sean vaquillonas o vacas respectivamente) o de eCG (1000-1250 UI, en forma subcutánea, según sean vaquillonas o vacas respectivamente) son incapaces de producir respuesta ováricas compatibles con un tratamiento superovulatorio por ausencia de respuesta en un caso o insuficiencia en el otro.
- La respuesta superovulatoria que se obtiene con el tratamiento de dosis reducidas de gonadotropinas aplicadas en dosis única (FSH-P+eCG) es debida al efecto combinado de ambas gonadotropinas y no de una de ellas en particular. Esta respuesta es similar en vaquillonas y vacas.

Además, se corroboró lo observado en la sección 1.1.:

- La presencia de un folículo dominante en crecimiento afecta negativamente la respuesta superovulatoria.
- El nivel de progesterona al momento de iniciar un tratamiento superovulatorio afecta la respuesta al mismo. Niveles mayores o iguales a 5 ng/ml de plasma se relacionan

con una mayor respuesta en cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables.

2. Control de la dinámica folicular mediante la administración de progesterona. Su importancia en tratamientos superovulatorios.

2.1. Evaluación de tres dosificaciones de progesterona exógena para inducir niveles endógenos capaces de controlar la onda de crecimiento folicular.

2.1.1. Introducción

El nivel plasmático de progesterona afecta el destino del folículo dominante. Cuando los niveles son altos (fase luteal), este no llega a ovular y regresa (folículo dominante no ovulatorio), originándose una nueva onda de crecimiento folicular. Por el contrario cuando los niveles son bajos a consecuencia de la luteólisis natural o inducida, el folículo dominante culminará su desarrollo con la ovulación (Savio y otros, 1990; Lucy y otros, 1992).

Se ha sugerido que existe un nivel umbral en la concentración de progesterona, el cual, una vez alcanzado, afecta el destino del folículo dominante. Adams y otros (1992) mantuvieron los niveles de dicha hormona a un valor promedio de 9,3 ng/ml durante la fase de crecimiento del folículo dominante e inhibieron su desarrollo. Por otro lado, Savio y otros (1991) con niveles de progesterona de 5-5,5 ng/ml fueron incapaces de modificar la dinámica folicular. Sin embargo, según las observaciones de Taylor y Rajamahendran (1994), los animales que tuvieron un nivel plasmático de progesterona mayor a 5 ng/ml tuvieron un mayor número de ondas de crecimiento folicular que aquellas con un nivel inferior. Estas observaciones (Savio y otros, 1991; Taylor y Rajamahendran, 1994) plantean que el nivel de progesterona en el cual se afecta la dinámica folicular parece no repetirse y surge la necesidad de estudiar diferentes niveles de dicha hormona para determinar aquel que mejor controle la dinámica folicular.

2.1.2. Objetivo

- Evaluar tres dosis de progesterona (200; 400 y 600 mg/día) para determinar con cual de ellos se logran niveles plasmáticos superiores a los de una fase luteal y en que medida estos son capaces de controlar la onda folicular.

2.1.3. Hipótesis

- El aumento en el nivel de progesterona plasmática a niveles superiores a los de una fase luteal normal afectan la dinámica folicular.

2.1.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El lugar es el indicado en la sección 1.1.4.A.

Se utilizaron 18 vacas Aberdeen Angus, con ciclos estrales previos regulares y una condición corporal de $7,8 \pm 0,15$ ($\bar{x} \pm e.e.$, escala 1 a 9; 1: excesivamente flaca, 9: excesivamente gorda; Richards y otros, 1986) a las que se sincronizó el celo de acuerdo a lo indicado en 1.1.4.A.

Las vacas fueron distribuidas en un diseño completamente aleatorizado en cuatro grupos correspondientes a cuatro tratamientos: T600 (n=5), 600 mg de progesterona/día; T400 (n=5), 400 mg de progesterona/día; T200 (n=4), 200 mg de progesterona/día y Control (n=4), una inyección diaria (2 a 6 ml) del vehículo utilizado para diluir la progesterona. Las inyecciones intramusculares fueron aplicadas desde el día 3 al 9 inclusive del ciclo estral.

La progesterona utilizada (Jebsen & Jebsen, G.m.b.H.&Co) cumplió con los controles de calidad previstos: polvo cristalino de coloración blanca levemente amarillenta, adecuada solubilidad e identificación, 98,2% de contenido de progesterona sobre base seca, rotación específica de 188° , punto de fusión de 128° , pérdida de peso sobre base seca de 0,11%, residuos sulfatados de 0,08% y adecuados tests de claridad en solución, de color en solución y de pureza microbiológica.

La progesterona fue diluida en cloroformo (25% del volumen final) y luego en aceite puro de girasol (75% del volumen) hasta alcanzar una concentración final de 100 mg de progesterona/ml de vehículo.

B. Detección de celos

La detección de celos se realizó según lo descrito en la sección 1.1.4.B., con el objetivo de determinar el día cero (celo).

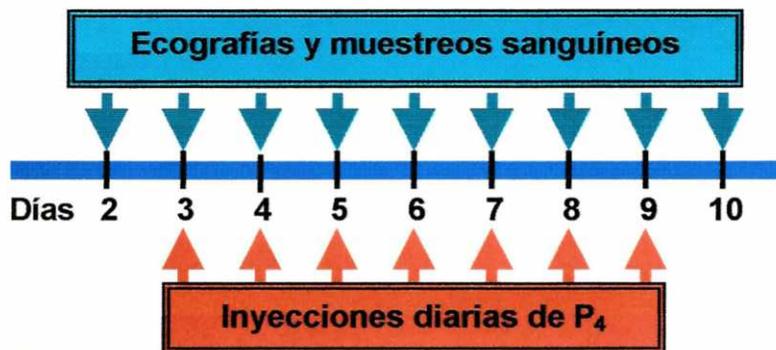
C. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal.

Se encuentran descritos en la sección 1.1.4.E., con las siguientes diferencias:

Los estudios ecográficos y el muestreo sanguíneo, realizados para determinar la relación entre el nivel de progesterona y la dinámica folicular, se llevaron a cabo diariamente entre los días 2 al 10 del ciclo estral (ver esquema).

En cada observación, cada ovario fue revisado varias veces en al menos dos planos. Se realizó un mapa ovárico y en él se dibujaron los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro, tomando como referencia la ubicación de los folículos mayor de 4 mm y/o del cuerpo lúteo.

Esquema de los momentos de realización de los estudios ecográficos, los muestreos de sangre y administración de progesterona:



D. Análisis estadístico

Se estudió el efecto de los tratamientos sobre:

- ◆ Nivel absoluto de progesterona plasmática y área bajo la curva del día 2 al 10 del ciclo estral.
- ◆ Diámetro del folículo que seguido durante el experimento tuvo el mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular del día 2 al 10.
- ◆ Número de folículos presentes en las diferentes clases estudiadas. Para esto se adoptó la clasificación de Savio y otros (1993a), quienes agruparon a los folículos en tres clases: Clase I, folículos de 3 a 4 mm; Clase II, folículos de 5 a 9 mm y Clase III, folículos \geq a 10 mm.
- ◆ Tasa de crecimiento del folículo dominante de la primera onda. La misma se calculó como la diferencia en el diámetro folicular entre los días 7 y 3 dividido 4 (Taylor y Rajamahendran, 1994).
- ◆ Día del máximo crecimiento.
- ◆ Tamaño del folículo dominante al día 7 y tamaño máximo de dicho folículo.

Como dato accesorio, se registró el diámetro del cuerpo lúteo del día 2 al 10 del ciclo estral. Esto se realizó para determinar si el nivel de progesterona generado por los tratamientos afectaba el desarrollo del mismo.

El procedimiento utilizado para realizar las comparaciones entre tratamientos se encuentra descrito en la sección 1.1.4.G.

Los datos pertenecientes al número de folículos dentro de las clases estudiadas, al diámetro del folículo de la primera onda y del cuerpo lúteo fueron transformados según la ecuación $y = \log(x+1)$ (Sokal y Rolft, 1981).

El modelo utilizado para las medidas repetidas en el tiempo fue el siguiente:

$$Y_{ijk} : \mu + \alpha_i + D_{(ij)} + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + E_{(ijk)}$$

Y_{ijk} : Variable respuesta perteneciente al jotaésimo individuo en el iésimo tratamiento y en el késimo punto muestral.

μ : Media general.

α_i : Efecto del iésimo tratamiento al cual los animales fueron asignados aleatoriamente.

$D_{(ij)}$: Representa el efecto aleatorio del individuo anidado dentro del tratamiento progesterona y corresponde al termino $E(ij)$ del modelo perteneciente a un diseño completamente aleatorizado con medidas no repetidas en el tiempo.

β_k : Efecto del tiempo en los distintos puntos muestrales, en el proceso de medidas repetidas dentro de un individuo.

$(\alpha\beta)_{ik}$: Representa la interacción del iésimo tratamiento con el késimo punto muestral.

$E_{(ijk)}$: Representa el error residual dentro de los individuos.

y en el caso de las medidas no repetidas en el tiempo:

$$Y_{ij} : \mu + T_j + E_{(ij)}$$

Y_{ij} : Variable respuesta perteneciente al iésimo individuo, en el jésimo tratamiento.

μ : Media general.

T_j : Efecto del jotaésimo tratamiento al cual los animales fueron asignados aleatoriamente.

$E_{(ij)}$: Representa el error experimental aleatorio.

La evaluación de las diferencias entre medias y la expresión de los resultados se realizó según lo descrito en la sección 1.1.4.G.

Dado que la interacción tratamiento x día fue significativa para las variables nivel de progesterona plasmática, diámetro del folículo de mayor tamaño de la primera onda, número de folículos Clase III y diámetro del cuerpo lúteo, el efecto de los tratamientos se estudio utilizando el área bajo la curva para la primera variable y el valor acumulado para las restantes.

2.1.5. Resultados

A. Niveles de progesterona plasmática

Se observó un efecto significativo del tratamiento, del día y de la interacción tratamiento x día sobre el nivel de progesterona plasmática ($P < 0,01$; Gráfico N°1).

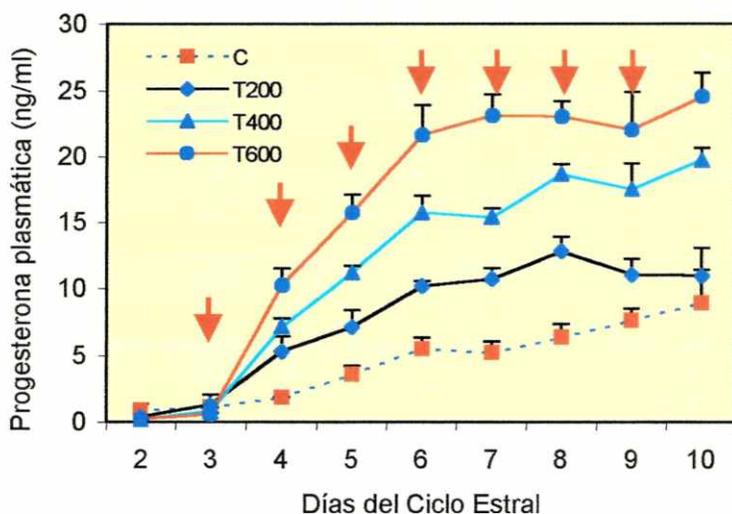


Gráfico N°1. Niveles de progesterona plasmática ($\bar{x} \pm ee$) en vacas inyectadas con 600 mg/día (T600), 400 mg/día (T400), 200 mg/día (T200), o 0 mg/día (C) de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral. \downarrow Inyecciones de progesterona.

El T600 tuvo mayor área bajo la curva del nivel de progesterona plasmático ($P < 0,01$; $128,8 \pm 4,2$ ng-día/ml) que los grupos Control ($36,8 \pm 2,8$ ng-día/ml), T200 ($64,8 \pm 4,0$ ng-día/ml) y T400 ($96,4 \pm 3,1$ ng-día/ml). Los tres últimos grupos difirieron entre sí ($P < 0,01$).

B. Dinámica folicular

B.1. Folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular

Se observó un efecto significativo de los tratamientos, del día y de la interacción tratamientos x día ($P < 0,01$) sobre el diámetro del folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular (Gráfico N°2).

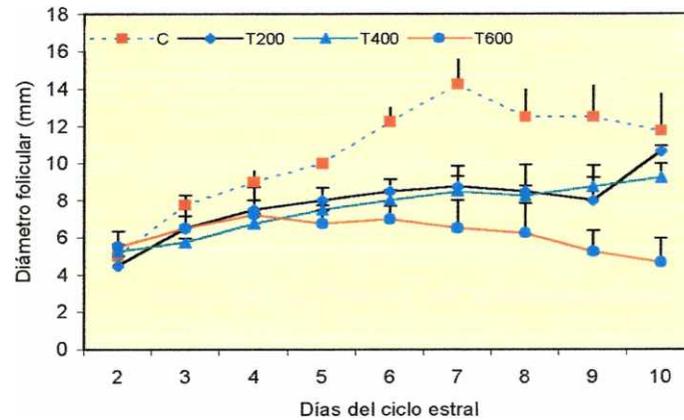


Gráfico N°2. Diámetro del folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular ($x \pm ee$) en vacas inyectadas con 600 mg/día (T600), 400 mg/día (T400), 200 mg/día (T200), o 0 mg/día (C) de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral.

El diámetro acumulado fue significativamente menor ($P < 0,05$) en los grupos T200 ($68,3 \pm 9,1$ mm), T400 ($67 \pm 2,2$ mm) y T600 ($53,6 \pm 3,3$ mm) comparado con el grupo Control ($95 \pm 5,8$ mm). Los tres primeros no difirieron entre sí ($P > 0,05$).

La tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular fue superior en el tratamiento Control ($1,63$ mm/día) comparado con las de T200 ($0,56$ mm/día, $P < 0,05$), T400 ($0,6$ mm/día, $P < 0,05$) y T600 ($0,11$ mm/día, $P < 0,01$).

El tamaño del folículo mayor al día 7 fue significativamente superior ($P < 0,01$) en el tratamiento Control con respecto a los otros tres tratamientos (Control: $14,3 \pm 1,3$ mm; T200: $8,8 \pm 1,1$ mm; T400: $8,2 \pm 1$ mm y T600: $6,4 \pm 0,9$ mm). Esta situación se mantuvo al comparar el tamaño máximo alcanzado ($P < 0,01$; Control: $14,8 \pm 1$ mm; T200: $10 \pm 1,1$ mm; T400: $9,4 \pm 0,6$ mm y T600: $8 \pm 0,7$ mm). En ambos parámetros, los tratamientos T200, T400 y T600 no difirieron entre sí ($P > 0,05$).

B.2. Clases foliculares

Se observó un efecto significativo del día ($P < 0,01$) y de los tratamientos ($P < 0,05$) sobre el número de folículos presentes en la clase I (3-4 mm).

Considerando los tratamientos, el Control tuvo un menor número de folículos promedio por día comparado con T200 ($P < 0,05$), T400 y T600 ($P < 0,01$; 3,4; 5,3; 6,4 y 7,8 respectivamente). T200 difirió de T600 ($P < 0,05$) y fue similar a T400 ($P > 0,05$); mientras que T400 y T600 fueron similares entre sí ($P > 0,05$, Gráfico N°3).

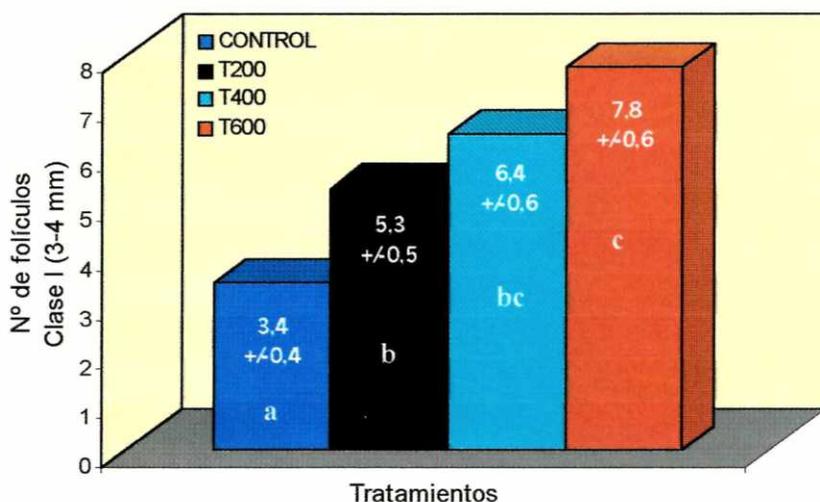


Gráfico N°3. Número de folículos promedio/día de la clase I (3-4 mm) en vacas inyectadas con 600 mg/día (T600), 400 mg/día (T400), 200 mg/día (T200), o 0 mg/día (C) de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral entre los días 2 y 10 del ciclo estral. Letras distintas difieren: a,b: $P < 0,05$; b,c: $P < 0,05$; a,c: $P < 0,01$.

En el Gráfico N°4 se puede observar el número de folículos pertenecientes a la Clase I independiente del tratamiento utilizado.

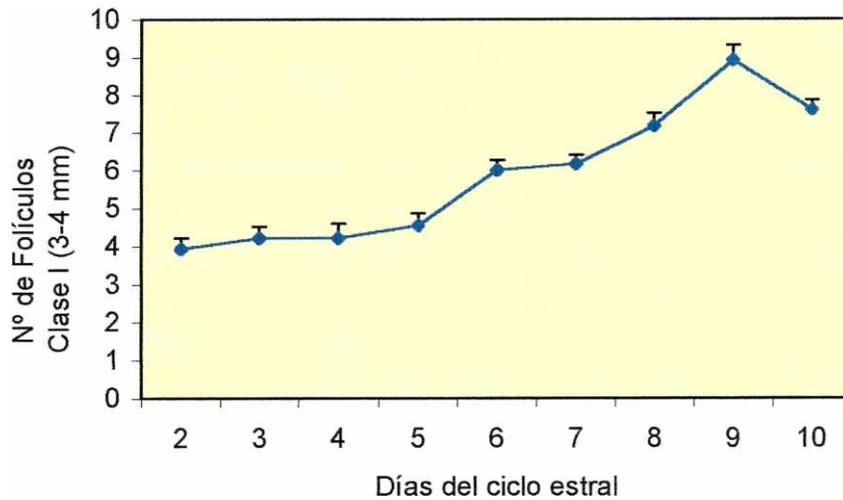


Gráfico N°4. Número promedio/día (\pm e.e.) de folículos de la Clase I (3-4 mm), independientemente del tratamiento utilizado.

Con respecto a los folículos de la clase II (5-9 mm) se observó un efecto del día ($P < 0,01$; Gráfico N°5), pero no de los tratamientos, ni de la interacción tratamiento x día ($P > 0,05$).

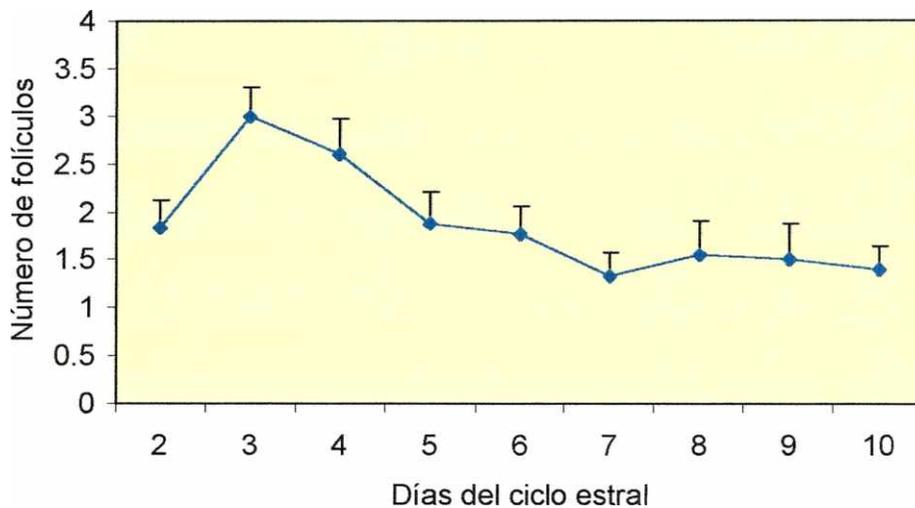


Gráfico N°5. Número promedio/día (\pm e.e.) de folículos de la clase II (5-9 mm), independientemente del tratamiento utilizado.

Por último, en los folículos de la clase III (≥ 10 mm), se observaron efectos significativos de los tratamientos, del día del ciclo estral y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,01$; Gráfico N°6).

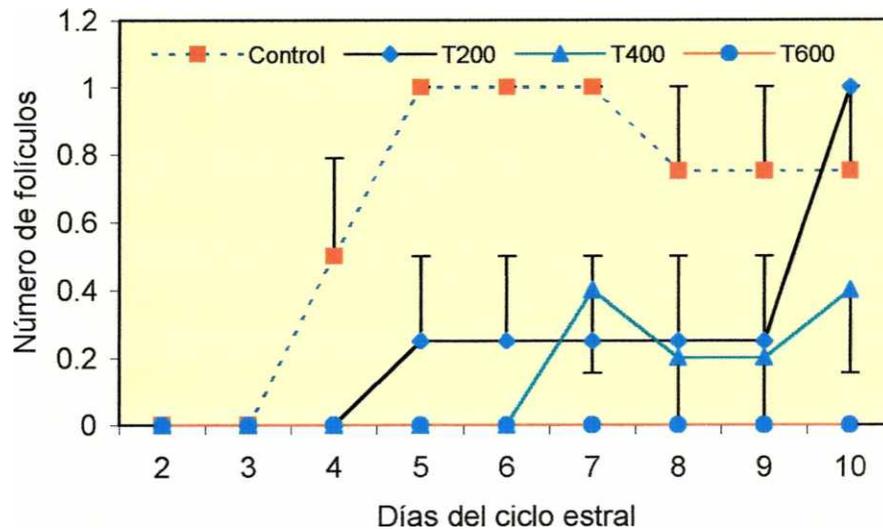


Gráfico N°6. Número de folículos ($\bar{x} \pm ee$) pertenecientes a la clase III en vacas tratadas con diferentes dosis de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral (T600: 600 mg/día, T400: 400 mg/día, T200: 200 mg/día y Control: 0 mg/día)

El Control tuvo el mayor número acumulado de folículos Clase III ($P < 0,05$; $5,8 \pm 0,9$) comparado con los tratamientos T200 ($2,3 \pm 1,3$), T400 ($1,2 \pm 0,7$) y T600 ($0,0 \pm 0,0$). Estos últimos no difirieron entre sí ($P > 0,05$).

C. Diámetro del cuerpo lúteo

Se observó un efecto significativo de los tratamientos ($P < 0,01$), del día ($P < 0,01$) y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,05$) sobre el diámetro del cuerpo lúteo. El T600 tuvo el menor diámetro acumulado ($P < 0,05$; $136,0 \pm 4,0$ mm) comparado con el T200 ($164,4 \pm 11,0$ mm), T400 ($164,0 \pm 6,0$) y Control ($164,1 \pm 10,4$ mm). Estos últimos no difirieron entre sí ($P > 0,05$).

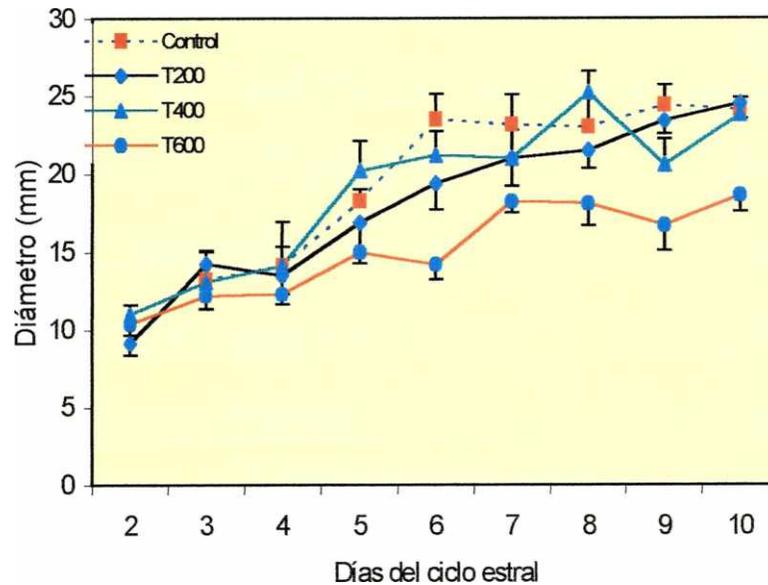


Gráfico N°7. Diámetro del cuerpo lúteo ($\bar{x} \pm ee$) en vacas inyectadas con diferentes dosis de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral (T600: 600 mg/día, T400: 400 mg/día, T200: 200 mg/día y Control: 0 mg/día)

2.1.6. Discusión

La inyección de progesterona desde el día 3 al 9 del ciclo estral, provocó cambios en los niveles plasmáticos de dicha hormona. Se observó la existencia de una relación dosis respuesta, es decir que un aumento en la progesterona exógena provocó un incremento en el nivel plasmático. Sin embargo, ya con las dosis más bajas evaluadas se observaron niveles similares o superiores a los descritos por Adams y otros (1992) como suficientes para el control de la onda. De acuerdo con ello, un alto nivel (>9 ng/ml) de progesterona en plasma es capaz de provocar cambios más notorios en la dinámica folicular. Así, en el tratamiento T600, los animales tuvieron un nivel plasmático promedio de dicha hormona superior a 15 ng/ml a partir del día 5 del ciclo estral y se afectó marcadamente el desarrollo del folículo de mayor tamaño ($<$ tasa de crecimiento, $<$ tamaño al día 7 y $<$ tamaño máximo). En ninguno de los animales, dicho folículo superó los 9 mm de diámetro. Además, se observó un aumento de la población de folículos de 3 a 4 mm, lo que plantea la hipótesis de una pérdida del efecto inhibitorio de dicho folículo sobre la mencionada población folicular. Sin embargo, con los niveles de P4 de los tratamientos T200 y T400 el folículo de mayor tamaño también tuvo afectada su tasa de crecimiento; pero creció más allá de los 9 mm, pudiendo observarse en algunos animales folículos de 11 y 12 mm.

Diversos estudios muestran una relación entre los niveles de progesterona y el desarrollo del folículo dominante; así: a) En un ciclo estral con 3 ondas, el diámetro máximo del folículo dominante de la primera onda fue mayor que el de la segunda (onda 1: mínima dominancia luteal durante la fase de crecimiento del folículo dominante) (Sirois y Fortune, 1988; Ginther y otros, 1989c). b) El diámetro máximo obtenido de un folículo dominante anovulatorio fue mayor en la primera onda de crecimiento folicular que en todas las ondas presentes en animales preñados (Ginther y otros, 1989b) y en vaquillonas tratadas con progesterona, no preñadas (Bergfelt y otros, 1991). c) Altos niveles de progesterona (endógena + exógena) provocaron que el folículo dominante de la segunda onda tuviera un diámetro mas pequeño que el presente en las ondas en las cuales los niveles de progesterona fueron menores (solo progesterona exógena; Bergfelt y otros, 1991).

En conclusión, cuando los niveles de progesterona son elevados el folículo dominante se ve afectado en su desarrollo y esto ha sido relacionado con una disminución en la frecuencia pulsátil de LH (Taylor y Rajamahendran, 1991b; Savio y otros, 1992; Taylor y otros, 1994). Si bien en el presente trabajo no se realizó un esquema de muestreo sanguíneo que permitiera determinar la frecuencia pulsátil de dicha hormona, se puede hipotetizar que el aumento en los niveles plasmáticos de progesterona en los diferentes tratamientos provocó una menor secreción pulsátil de LH que afectó el desarrollo del folículo de mayor tamaño.

Teniendo en cuenta que la secreción pulsátil de LH es necesaria para que los folículos crezcan más allá de los 9 mm de diámetro (Webb y otros, 1999) y que interviene en el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Peters y otros, 1994; Vizcarra y otros, 1997), se puede plantear que el grado de inhibición que la progesterona ejerció sobre la secreción de LH fue diferente según el tratamiento utilizado. Así, la mayor inhibición se habría producido en el tratamiento T600, en el cual ningún folículo creció más allá de los 9 mm de diámetro y se afectó el desarrollo del cuerpo lúteo. En los otros tratamientos (T200 y T400), se observaron algunos animales con folículos de 11 y 12 mm y el cuerpo lúteo tuvo un desarrollo similar al de los animales Control. Sanchez y otros (1995) plantearon que el efecto inhibitorio que ejerce la progesterona sobre la secreción de LH es dependiente del nivel de progesterona y da base a lo hipotetizado previamente sobre un efecto inhibitorio diferencial sobre la secreción de LH según el tratamiento utilizado.

La progesterona, además de ejercer su efecto sobre la secreción de LH, tendría un efecto directo en el ovario. Esta hormona podría afectar el desarrollo del folículo dominante actuando en el sistema enzimático ubicado en la capa granulosa de dicho folículo (Manikkan y Rajamahendran, 1997) y en consecuencia detener su desarrollo.

La ausencia de folículo dominante en los animales del tratamiento T600, plantea la posibilidad que en estos animales se puedan obtener mejores respuestas superovulatorias comparado con aquellas respuestas de animales que presentan un folículo dominante en crecimiento al momento de iniciar dichos tratamientos. Esto ha sido informado por

númerosos investigadores (Grasso y otros, 1989a; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995) y corroborado por los trabajos descritos en las secciones 1.1. y 1.2. Además, la respuesta superovulatoria se vería favorecida por el aumento en la población de folículos pequeños, tal cual lo citado en la bibliografía (Grasso y otros, 1989b, Romero y otros, 1991, Kawamata, 1994 y Kohram y otros, 1995).

2.1.7. Conclusiones

- Inyecciones diarias de progesterona, del día 3 al 9 del ciclo estral, provocan a partir de los 200 mg/día niveles plasmáticos de dicha hormona capaces de controlar o modificar la onda de crecimiento folicular.
- Niveles de progesterona superiores a 15 ng/ml (600 mg/día de progesterona) a partir del día 5 del ciclo estral inhiben el desarrollo del folículo dominante, aumentan la población de folículos de 3-4 mm y afectan el desarrollo del cuerpo lúteo.

2.2. Efecto del nivel de progesterona plasmática modificado por inyecciones intramusculares sobre la respuesta superovulatoria.

2.2.1. Introducción

La respuesta superovulatoria es afectada por las características del folículo dominante y por el número de folículos pequeños presentes al momento de comenzar el tratamiento. Nuestros trabajos anteriores así como el de diversos investigadores han demostrado que la presencia de un folículo dominante en crecimiento tiene efectos depresores de la respuesta al tratamiento (Grasso y otros, 1989a; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995). Por el contrario, un mayor número de folículos pequeños la favorece (Grasso y otros, 1989b; Romero y otros, 1991; Kawamata, 1994; Kohram y otros, 1995).

En la sección 2.1. se demostró que inyecciones diarias de 200, 400 o 600 mg/día de progesterona, del día 3 al 9 del ciclo estral, provocaban un aumento en los niveles de dicha hormona, afectando el desarrollo del folículo dominante. No obstante, solo la dosis de 600 mg/día fue la que anuló todo crecimiento folicular más allá de los 9 mm de diámetro y provocó un aumento en la población de folículos de 3-4 mm. En consecuencia, esta situación ovárica, sería la más adecuada para favorecer la respuesta a un tratamiento de superovulación y dado que en el día 7 del ciclo estral, se encontraron las características ováricas mencionadas previamente, no sería necesario prolongar el tratamiento con progesterona más allá de dicho día.

2.2.2. Objetivo

- Evaluar la respuesta superovulatoria de vacas tratadas con progesterona en los primeros días del ciclo estral (días 3 a 7) y superovuladas a partir del día 7 en relación con la de aquellas que no reciben progesterona y que son superovuladas a partir del día 7 u 8/9 de su ciclo estral.

2.2.3. Hipótesis

- El ambiente ovárico generado por la administración de 600 mg/día de progesterona entre los días 3 al 7 del ciclo estral elimina la presencia de folículos dominantes en crecimiento y aumenta la presencia de folículos pequeños lo que produce un aumento en la respuesta superovulatoria, comparada con la de vacas que no recibieron progesterona.

2.2.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El lugar es el indicado en la sección 1.1.4.A.

Se utilizaron 26 vacas Aberdeen Angus, con actividad sexual cíclica previa y con una condición corporal de $7,6 \pm 0,1$ ($\bar{x} \pm e.e.$; escala 1 a 9; 1: excesivamente flaca, 9: excesivamente gorda; Richards y otros, 1986).

El ciclo estral de los animales fue sincronizado según lo indicado en la sección 1.1.4.A.

Las vacas fueron distribuidas según un diseño completamente aleatorizado en dos grupos correspondientes a dos tratamientos:

- ◆ *P600 (n: 14)*: 600 mg de progesterona/día, intramuscular (IM), entre los días 3 al 7 del ciclo estral inclusive. En este día comenzó el tratamiento superovulatorio.

Las características de la progesterona inyectada y la forma en que fue diluida se encuentran descritas en la sección 2.1.4.A.

- ◆ *Control (n: 12)*: 6 ml de aceite de girasol/día, intramuscular (vehículo de la progesterona) entre los días 3 al 7 del ciclo estral inclusive. El tratamiento superovulatorio comenzó en los días 7 (n:3) u 8-9 (n:9) del ciclo estral.

El tratamiento de estimulación ovárica en ambos grupos se realizó con un extracto purificado de pituitarias porcinas (Foltropin-V[®], Vetrepharm, Inc.). El contenido de cada frasco de 20 ml, equivalente a 400 mg de NIH-FHS-P1, se diluyó en una solución bacteriostática de cloruro de sodio para inyección, quedando a una concentración final de 20 mg/ml. El tratamiento fue administrado cada 12 horas (mañana y tarde) durante 4 días, inyectando cada vez 2,5 ml de la solución por vía intramuscular. A las 48 y 60 horas de comenzado el tratamiento se administraron 500 μ g y 250 μ g de cloprostenol, intramuscular (CX0.1[®], López & Villanueva).

B. Detección de celos y servicios

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.B.

C. Respuesta superovulatoria

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.C

D. Recolección y evaluación de embriones

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.D.

E. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal

Se encuentran descritos en las sección 1.1.4.E. y 2.1.4.C., con las siguientes diferencias:

Los estudios ecográficos en el grupo P600, se realizaron del día 3 al 7 del ciclo estral. En el grupo Control comenzaron en el tercer día previo al inicio del tratamiento de estimulación ovárica y se repitieron en los tres días siguientes. Por último, en ambos grupos se realizó una ecografía ovárica en el momento de efectuar la recolección de embriones con la finalidad de evaluar el número de cuerpos lúteos.

El muestreo sanguíneo se realizó, en forma diaria, por punción yugular desde el día 3 del ciclo estral hasta el momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica. En el grupo P600 se tomaron muestras adicionales de sangre del día 8 al 19 con la finalidad de determinar los niveles de progesterona durante y a posteriori del tratamiento superovulatorio.

F. Nivel de progesterona y respuesta superovulatoria

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.F.

G. Análisis estadísticos

Para realizar el análisis estadístico, se estudió:

1) El efecto de los tratamientos sobre:

- ◆ Nivel absoluto de progesterona plasmática y área bajo la curva del día 3 al 9 del ciclo estral.
- ◆ Diámetro del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular o de aquel que seguido durante el experimento tuvo el mayor tamaño.
- ◆ Tamaño del folículo dominante al día 7.
- ◆ Número de folículos presentes en las diferentes clases estudiadas del día 3 al 9 del ciclo estral. Para esto se adoptó la clasificación descrita en la sección 2.1.4.D.

- ◆ Población folicular 12 horas post tratamiento superovulatorio.
- 2) El efecto de la presencia de un folículo dominante en crecimiento al momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta superovulatoria.
 - 3) El efecto del nivel de progesterona en el momento de aplicar los tratamientos superovulatorios sobre la respuesta al mismo.

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron según lo descrito en la sección 2.1.4.D.

El modelo utilizado para las variables que fueron repetidas o no en el tiempo, se encuentran descrito en la sección 2.1.4.D.

Las variables: número de folículos dentro de las clases estudiadas, tamaño de los folículos de la primera onda, población folicular 12 hs post tratamiento superovulatorio, fueron transformados utilizando la ecuación $y = \log(x+1)$ (Sokal y Rolft, 1981).

Todos los datos se expresan como el $\bar{x} \pm e.e.$

Dado que la interacción tratamiento x día fue significativa para las variables nivel de progesterona plasmática y número de folículos Clase III, el efecto de los tratamientos se estudio utilizando el área bajo la curva para la primera variable y el valor acumulado para la restante. En esta última se tuvo en cuenta las observaciones realizadas del día 4 al 7 del ciclo estral.

2.2.5. Resultados

A. Nivel de progesterona plasmática

Se observó un efecto significativo del día, del tratamiento y de la interacción tratamiento x día sobre el nivel plasmático de progesterona ($P < 0,01$; Gráfico N°8).

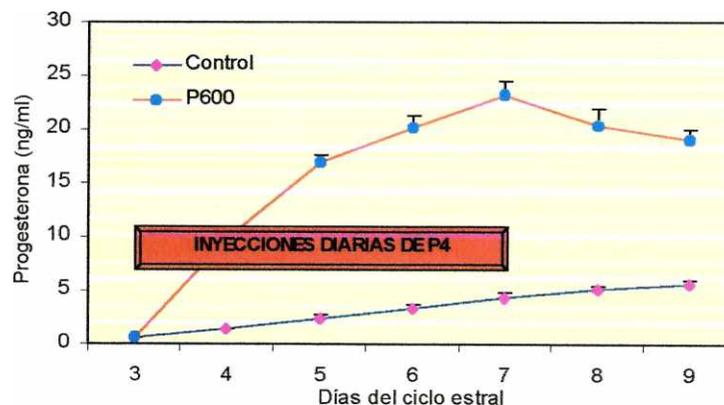


Gráfico N°8. Niveles plasmáticos de progesterona ($\bar{x} \pm e.e.$) en vacas pertenecientes a los tratamientos Control y P600 (recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral).

Del día 3 al 7 del ciclo estral, el área bajo la curva de progesterona fue significativamente superior en el tratamiento P600 ($59,5 \pm 1,9$ ng-día/ml vs. $10,7 \pm 0,6$ ng-día/ml; $\bar{x} \pm e.e.$; $P < 0,01$).

Los niveles de progesterona se mantuvieron elevados luego de la última inyección de progesterona (>18 ng/ml) hasta que se administró el agente luteolítico (día 9); a partir de ese momento disminuyeron a $6,18$ ng/ml. Este valor se observó el día en que se esperaba que los animales manifestaran su celo post tratamiento superovulatorio. El nivel plasmático fue superior a 1 ng/ml hasta el día 18 del ciclo estral (Gráfico N°9).

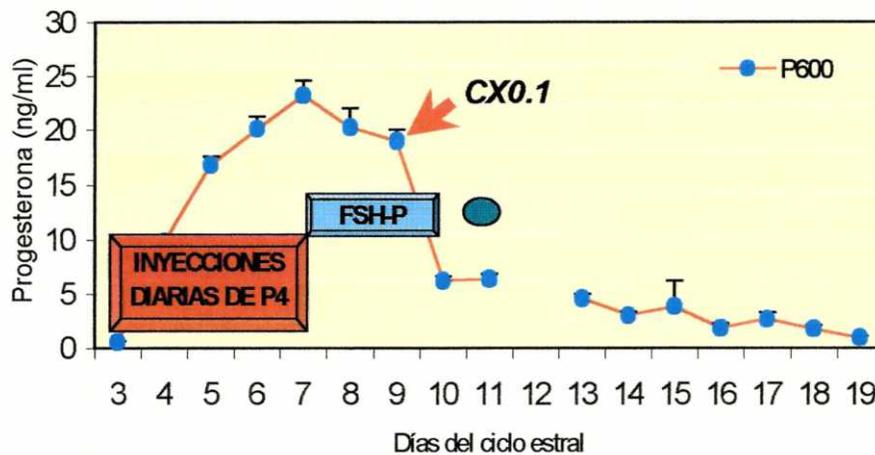


Gráfico N°9. Niveles de progesterona plasmática ($\bar{x} \pm ee$) en vacas que recibieron una dosis diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral.

FSH-P Período en el que se realizó el tratamiento superovulatorio. ● Día del celo esperado.

B. Dinámica folicular

B.1. Folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular

El diámetro del folículo más grande de la primera onda de crecimiento folicular fue mayor en los animales pertenecientes al Control ($P < 0,01$; Gráfico N°10) en todos los días observados ($7,8 \pm 0,33$ y $12,1 \pm 0,36$; $P < 0,01$).

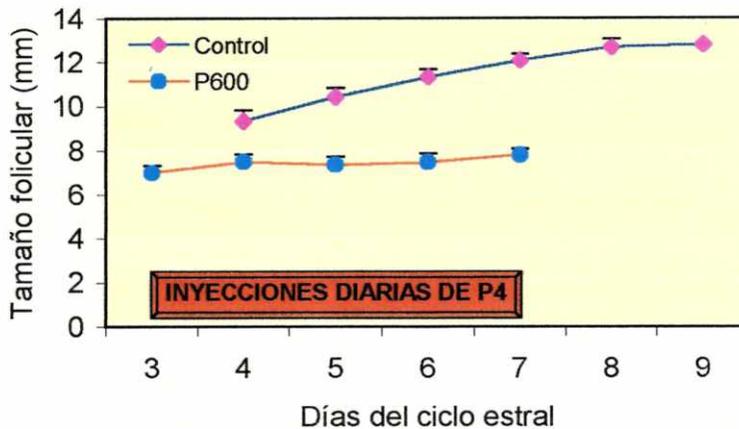


Gráfico N°10. Diámetro del folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular ($\bar{x} \pm ee$) en vacas de los tratamientos Control y P600 (recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral).

B.2. Clases foliculares

Se observaron efectos significativos del día y del tratamiento ($P < 0,01$) sobre el número de folículos pertenecientes a la clase I (3-4 mm, Gráfico N°11). Las vacas pertenecientes al P600 tuvieron el mayor número de este tipo de folículos.

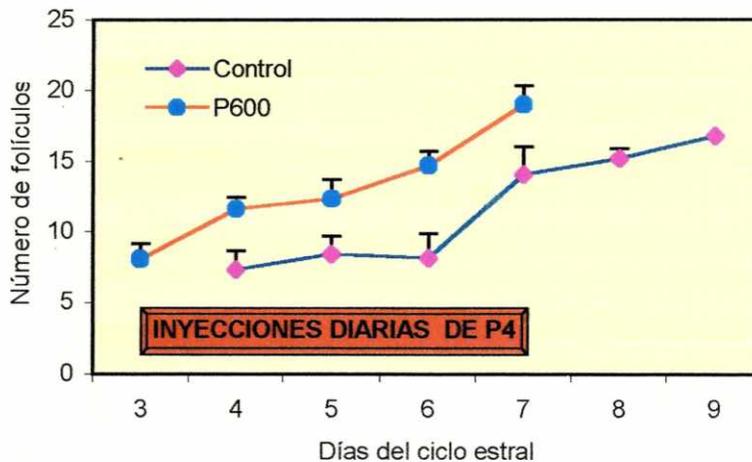


Gráfico N°11. Número de folículos Clase I (3-4 mm) en vacas de los tratamientos Control y P600 (recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $\bar{x} \pm ee$. Efecto tratamiento: $P < 0,01$

Con respecto a la clase II (5-9 mm), se observó un efecto significativo del día ($P < 0,01$; Gráfico N°12); no así del tratamiento ni de la interacción tratamiento x día.

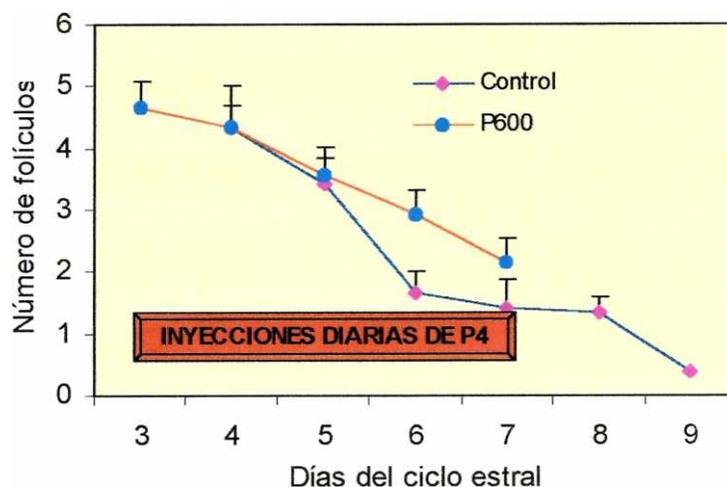


Gráfico N°12. Número de folículos Clase II (5-9 mm) en vacas de los tratamientos Control y P600 (recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $x \pm ee$.

Por último, se observaron efectos del día, del tratamiento y de la interacción tratamiento x día sobre el número de folículos ≥ 10 mm ($P < 0,05$). El tratamiento Control tuvo el mayor número acumulado de folículos ($4 \pm 0,4$ vs 0 ± 0 ; $P < 0,01$) (Gráfico N°13).

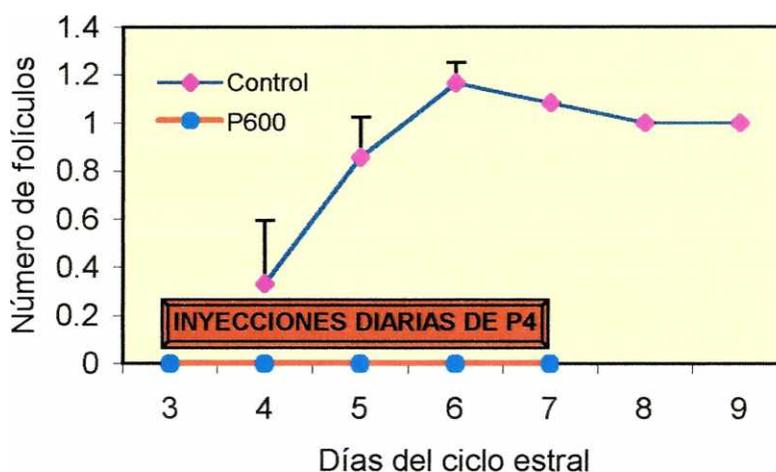


Gráfico N°13. Número de folículos Clase III (≥ 10 mm) en vacas de los tratamientos Control y P600 (recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $x \pm ee$.

C. Respuesta superovulatoria

En el grupo P600 no se observó celo post tratamiento superovulatorio debido a que todos los animales presentaron un nivel de progesterona plasmática > 1 ng/ml (Gráfico N°9) y en consecuencia, ninguna de las vacas ovuló. Contrariamente, el 100% de las vacas pertenecientes al grupo Control manifestó celo a las $50,8 \pm 0,8$ horas de inyectado el agente luteolítico; no existiendo diferencias entre animales con o sin respuesta superovulatoria ($51,0 \pm 1,1$ hs. y $50,3 \pm 2,1$ hs. respectivamente; $P > 0,05$).

C.1. Población folicular en el día del celo (Control) o celo esperado (P600)

En el grupo P600 se observó un mayor número de folículos pertenecientes a la clase III ($P < 0,01$) y un menor número de folículos de la clase II ($P < 0,05$) en el momento del celo esperado (Gráfico N°14) que en el grupo Control. En los folículos de clase III del grupo P600, el tamaño folicular fue muy homogéneo (11-12 mm)

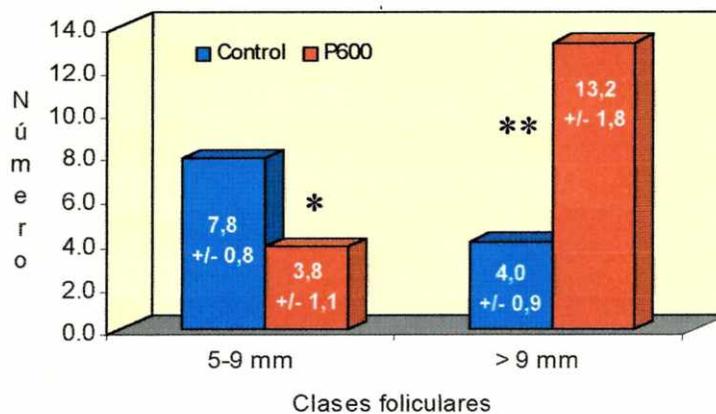


Gráfico N°14. Número promedio (\pm e.e.) de folículos Clases II y III en el momento del celo (tratamiento Control) y del celo esperado en las vacas que recibieron una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral (P600). Dentro de cada clase difieren: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

C.2. Porcentaje de vacas con respuesta y número de cuerpos lúteos, de embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar en el tratamiento Control

El 66,7% de las vacas del tratamiento Control respondieron al tratamiento superovulatorio, no existiendo diferencias entre las que comenzaron el tratamiento los días 7 u 8/9 del ciclo estral. Lo mismo sucedió con la respuesta superovulatoria ($P > 0,05$; Cuadro N° 16)

Cuadro N°16. Número de cuerpo lúteos (CL), de embriones totales (ET), transferibles (Etrans), congelables (Econg), degenerados (Edeg) y de ovocitos sin fertilizar (Ovo) en el tratamiento Control según el día en que comenzó el tratamiento superovulatorio.

Tratamientos	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
Control 7	4,3±1,2	3±1,5	2,3±2,2	2±2,2	0,7±0,4	0,1±0,1
Control 8/9	5,8±1,5	4,4±1,7	3,3±1,6	3±1,5	1±0,3	0,1±0,2

Los porcentajes de recolección de embriones totales, de embriones transferibles y de embriones congelables fueron de 64,4±14,04; 66,6±8,4 y 61,3±7,1 respectivamente.

C.3. Efecto del estadio del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria

El 41,7 % de las vacas presentaron un folículo dominante en crecimiento al momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica; no existiendo diferencias entre animales que comenzaron el tratamiento de estimulación ovárica en los días 7 (33,3%) u 8/9 (44,4%).

Se observó un efecto altamente significativo ($P<0,01$) del estadio del folículo dominante al momento de comenzar el tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo. Aquellos animales que tuvieron un folículo dominante en fase de meseta presentaron una mayor respuesta en cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables que aquellas que tuvieron un folículo dominante en crecimiento (Gráfico N°15). Además, el porcentaje de recolección de embriones fue menor en el grupo de animales que tuvieron un folículo dominante en crecimiento (40±24,5 vs 84,7±3,1; $P<0,01$).

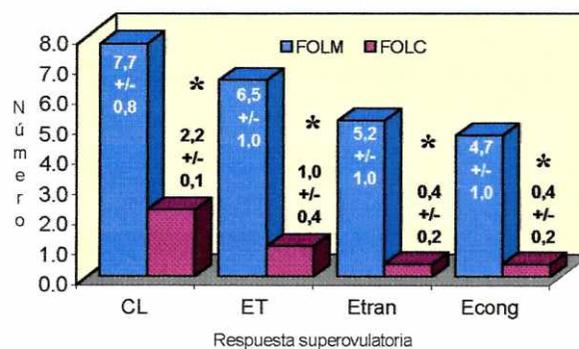


Gráfico N°15. Número promedio (\pm e.e.) de cuerpos lúteos (CL), de embriones totales (ET), embriones transferibles (Etrans) y congelables (Econg) según tuvieron un folículo dominante en crecimiento (FOLC) o en meseta (FOLM) al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio en el tratamiento Control. * Dentro de cada parámetro difieren: $P<0,01$.

C.4. Efecto del nivel de progesterona plasmático al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo

No se observó efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo (Cuadro N°17).

Cuadro N°17. Efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo.

Progesterona	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
≥ 5 ng/ml	6,6±1,6	5,2±2,0	3,8±1,8	3,5±1,7	1,3±0,4	0,0
< 5 ng/ml	3,8±0,9	2,6±1,1	2±1,1,0	1,8±0,9	0,4±0,2	0,2±0,2

Referencias : ET: Embriones Totales. Etrans.: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar

C.5. Relación entre los folículos ≥ 8 mm al momento del celo y ovulación

Los folículos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 mm presentes al momento del celo post tratamiento ovularon en un 29%, 66,7%, 92,9%, 100%, 100%, 100%, 100% y 100% respectivamente (Gráfico N°16).

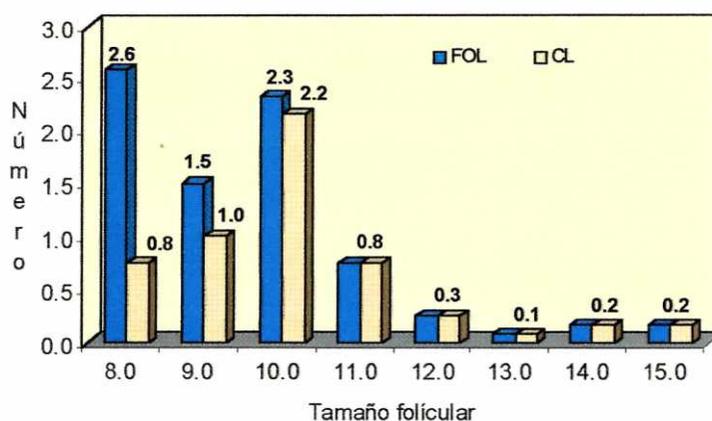


Gráfico N°16. Relación entre el número de folículos ≥ 8 mm al momento del celo post tratamiento y el número de cuerpos lúteos formados.

C.6. Respuesta superovulatoria estimada en el tratamiento P600

La respuesta superovulatoria estimada del grupo P600, calculada a partir del porcentaje de ovulación de cada uno de los folículos ≥ a 8 mm y del número de cuerpos lúteos y embriones totales, transferibles y congelables observados en el Control, se puede observar en el Cuadro N°18.

Cuadro N°18. Número ($\bar{x} \pm ee$) estimado de cuerpos lúteos (CL), de embriones totales (ET), transferibles (Etrans), congelables (Econg), degenerados (Edeg) y de ovocitos sin fertilizar (Ovo) en el tratamiento P600.

CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
12,8±0,8	10,8±0,7	8,1±0,5	7,4±0,5	2,5±0,2	0,25±0,02

2.2.5. Discusión

La administración de progesterona en el tratamiento P600, provocó un aumento en el nivel plasmático de la hormona tal como se reportó en la sección 2.1.

El prolongado período en que los niveles de progesterona permanecieron en valores superiores a 1 ng/ml de plasma, luego de inyectado el agente luteolítico, no fue el esperado y puede atribuirse a un retardo en la absorción y metabolismo del vehículo que generó un depósito de liberación lenta de dicha hormona. Taylor y Rajamahendran (1994), utilizando la misma vía de administración y similar vehículo (aceite de maíz en lugar de aceite de girasol), con inyecciones en los días 3 (200 mg), 4 (100 mg) y 5 (50 mg) del ciclo estral y una inyección de PGF₂ α en el día 7, no observaron modificaciones en el tiempo en que los niveles de progesterona descendieron a un valor menor de 1 ng/ml de plasma, comparado con aquellos animales que no recibieron progesterona. No obstante, en el presente trabajo se utilizó una dosis mayor de progesterona y un mayor número de inyecciones, lo que podría explicar parte de las divergencias observadas. Adams y otros (1992), informaron que luego de administrar progesterona a animales con luteólisis previa, vía subcutánea, por un período de 14 días, el tiempo para que los niveles descendieron a un valor menor a 1 ng/ml fue prolongado y estuvo relacionado con las dosis utilizadas. A pesar que la vía de administración fue diferente, esta observación podría aplicarse a lo sucedido en el presente trabajo.

En el tratamiento P600 se observó un aumento en el nivel de progesterona plasmática a valores superiores a 15 ng/ml de plasma a partir del día 5 del ciclo estral. Esto es coincidente con lo observado en la sección 2.1. y habría provocado una depresión en los niveles de LH a tal punto que no se observaron folículos mayores a 9 mm de diámetro al momento de comenzar con el tratamiento superovulatorio. Esta hipótesis se basa en que para que los folículos crezcan mas allá de dicho tamaño, se requieren niveles adecuados de la mencionada gonadotrofina (Webb y otros, 1999).

El tratamiento de estimulación ovárica utilizado (Foltropin-V) contiene bajas cantidades de LH (Amstrong y Opavske, 1986), lo cual fue suficiente para que se estimule el crecimiento de un gran número de folículos y continuar su desarrollo mas allá de los 9 mm, a pesar de los elevados niveles de progesterona. El efecto estimulador de las gonadotrofinas, habría sido favorecido por la ausencia de un folículo dominante al momento de comenzar con el tratamiento gonadotrófico y por el mayor número de folículo de 3-4 mm presentes en dicho momento, lo que se reflejó en un mayor número de

foliculos mayores o iguales a 10 mm en el momento esperado del celo. Se ha demostrado que la presencia de un folículo dominante en crecimiento en el momento de comenzar con un tratamiento de estimulación ovárica, deprime la respuesta al mismo (Sección 1.1. y 1.2., Grasso y otros, 1989a; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995) y la presencia de folículos pequeños la favorece (Grasso y otros, 1989b; Romero y otros, 1991; Kawamata, 1994; Kohram y otros, 1995), lo que da base a lo previamente planteado.

La respuesta folicular observada en el momento esperado del celo en el tratamiento P600, permite hipotetizar que si se hubieran controlado adecuadamente los niveles de progesterona (disminución a menos de 1 ng/ml en el momento del celo esperado), se hubiera obtenido una muy buena respuesta superovulatoria, tal cual fue estimado en los resultados presentados. Esta respuesta hubiera coincidido con la que obtuvieron diversos investigadores que indujeron superovulación en animales con una dinámica folicular controlada mediante diferentes tratamientos hormonales (Bo y otros, 1996; Caccia y otros, 1998; Bo y Mapletoft, 1999; Caccia y otros, 1999).

El porcentaje de vacas que respondió al tratamiento superovulatorio en el grupo Control (66,7%) es coincidente con lo informado por Vos y otros (1983), quienes determinaron que entre el 60 y el 70% de los animales tuvieron más de 3 ovulaciones. No obstante, se debe considerar que en la bibliografía se encuentran rangos de respuestas de 60 a 100% (Donaldson, 1984c; Lindsell y otros, 1986; Calder y Rajamahendran, 1992; Sanchez Garcia y otros, 1992; Alvarez y otros, 1995), encontrándose nuestros resultados en el límite inferior.

Si bien existen numerosos factores que afectan la respuesta superovulatoria y explican la variabilidad de los resultados obtenidos (Kafi y McGowan, 1997); en el presente trabajo, las vacas que no respondieron al tratamiento superovulatorio tuvieron un folículo dominante en crecimiento, que como fue mencionado antes, deprime la respuesta al mismo (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995). Esto plantea que el estado ovárico al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio fue la principal causa de la baja respuesta observada.

El nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio no estuvo relacionado con la respuesta al mismo. A diferencia de lo observado en las secciones 1.1. y 1.2. los animales con niveles de progesterona \geq a 5 ng/ml tuvieron en un 33,3% un folículo dominante en fase de crecimiento al inicio del tratamiento de estimulación ovárica que como fue discutido es causa de una menor respuesta superovulatoria. En las secciones 1.1. y 1.2. el porcentaje de animales con folículos en fase de crecimiento fue 13,3 % y 0% respectivamente. Esto plantea que diferencias en la proporción de los estadios del folículo dominante determinarían la mayor o menor respuesta en los animales con progesterona igual o mayor a 5 ng/ml y explicarían parte de las divergencias observadas entre ensayos.

Con respecto al día en que comenzó el tratamiento superovulatorio, no existieron diferencias entre las vacas que fueron estimuladas a partir del día 7 u 8/9 del ciclo estral. Dada la variabilidad de las ondas de crecimiento folicular (1 a 4), en el día 7 puede o no existir la presencia de un folículo dominante en crecimiento. Según ocurra uno u otro hecho será la respuesta superovulatoria observada.

Por último, el porcentaje de embriones recolectados (64,4%) se encuentra dentro de los valores informados por varios investigadores (46,6-87%; Romero y otros, 1991; Garcia Bojalil y otros, 1994; Sanchez Garcia y otros, 1992; Walsh y otros, 1993; Wubishet y otros, 1986; Olivera Angel y otros, 1984; Alcivar y otros, 1984) y estuvo afectado por la presencia de un folículo dominante en crecimiento. En ausencia de éste, el porcentaje fue del 84,7%, el cual es coincidente con lo obtenido por diversos investigadores (Alcivar y otros, 1984; Wubishet y otros, 1986 y Romero y otros, 1991). Por el contrario, la presencia de un folículo dominante en crecimiento deprimió el porcentaje de recolección, no encontrándose una explicación al respecto.

2.2.6. Conclusiones

➤ La administración diaria de 600 mg de progesterona, del día 3 al 7 del ciclo estral produce un aumento en el nivel plasmático de dicha hormona a partir del día 4, con los siguientes efectos sobre la dinámica folicular:

- Menor tasa de crecimiento y menor tamaño al día 7 del ciclo estral del folículo de mayor tamaño.
- Ausencia de folículos mayores a 10 mm de diámetro.
- Aumento en la población de folículos pertenecientes a la clase I (3-4 mm).
- Ausencia de manifestación de celo luego de inyectado un agente luteolítico en el día 9 del ciclo estral, debido a la presencia de niveles de progesterona superiores a 1 ng/ml en el momento del celo esperado.

➤ La estimulación ovárica con Folltropin V[®] en animales que reciben una inyección diaria de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral produce una población de folículos \geq a 10 mm, 12 horas posteriores a la última inyección del tratamiento superovulatorio, superior a la de aquellos animales que no reciben suplementación de progesterona.

2.3. Efecto del nivel de progesterona modificado por progesterona exógena aplicada por medio de esponjas intravaginales sobre la dinámica folicular

2.3.1. Introducción

El aumento en la concentración plasmática de progesterona durante la fase de crecimiento del folículo dominante de la primera onda de desarrollo folicular retarda el desarrollo del mismo (Adams y otros, 1992). Así, en la sección 2.1. se observó que un aumento en los niveles de progesterona a valores $>$ a 15 ng/ml del día 5 al 9 del ciclo estral, mediante inyecciones intramusculares, provocó una disminución de la tasa de crecimiento folicular y del tamaño folicular. No obstante, cuando se suspendió la administración de progesterona y se inyectó $\text{PGF}_{2\alpha}$, los animales no ovularon ni manifestaron celo debido a que los niveles de progesterona permanecieron por encima de 1 ng/ml durante un período prolongado. Esto demostró que si bien se pudo controlar el desarrollo folicular por este medio, la vía intramuscular no fue la más adecuada para permitir la ovulación y la aparición del celo post tratamiento por mantenimiento de un inadecuado ambiente hormonal (alta progesterona) después de finalizada su aplicación (sección 2.2.).

Otros investigadores han utilizado la vía intravaginal para aumentar los niveles de progesterona (Sirois y Fortune, 1990; Savio y otros, 1993a; D'Occhio y otros, 1997). Estos autores han utilizado 1 a 3 CIDR ("*Controlled internal drug release*") impregnados con progesterona, observando una rápida disminución en los niveles de dicha hormona luego de retirado los dispositivos. En consecuencia, esta vía aparece como una de las más adecuadas para controlar los niveles de progesterona en forma precisa. De acuerdo con esta información previa, fue propuesto el siguiente objetivo e hipótesis:

2.3.2. Objetivo

- Estudiar el efecto de la administración de progesterona aplicada por medio de esponjas intravaginales recambiadas diariamente entre los días 3 al 7 del ciclo estral, sobre la dinámica folicular.

2.3.3. Hipótesis

- El uso de esponjas intravaginales impregnadas con progesterona, recambiadas diariamente, entre los días 3 a 7 del ciclo estral, genera un aumento en sus niveles plasmáticos relacionados con la dosis utilizada. Este aumento produce una menor tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño y ausencia de folículo dominante en crecimiento al día 7 del ciclo estral.

2.3.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El lugar es el indicado en la sección 1.1.4.A.

Se utilizaron 8 vacas Aberdeen Angus, con ciclos estrales regulares previos y una condición corporal de $8,2 \pm 0,09$ ($\bar{x} \pm e.e.$; escala 1 a 9, 1: excesivamente flaca, 9: excesivamente gorda; Richards y otros, 1986).

El ciclo estral de los animales fue sincronizado según lo descrito en la sección 1.1.4.A.

Las vacas fueron distribuidas según un diseño completamente aleatorizado en tres grupos correspondientes a tres tratamientos:

- ◆ *E6 (n:3)*: Esponja intravaginal con 5,7 g de progesterona, que fue renovada en forma diaria entre los días 3 y 7 del ciclo estral.

Se utilizaron 5,7 g basándose en los niveles plasmáticos informados por D'Occhio y otros (1997), quienes utilizaron 3 CIDR (1,9 g x 3) para estudiar el efecto de la progesterona sobre la dinámica folicular. Además, se realizó un recambio diario de las esponjas para asegurar que la cantidad de progesterona a absorber diariamente no fuera limitante.

- ◆ *E11 (n: 3)*: Esponja intravaginal con 11 g de progesterona, que fue renovada en forma diaria entre los días 3 y 7 del ciclo estral.

D'Occhio y otros (1997) obtuvieron un nivel de progesterona en plasma de 14,7 ng/ml en el día 7 del ciclo estral al utilizar 3 CIDR. Este valor es inferior al obtenido en vacas inyectadas con 600 mg de progesterona/día del día 3 al 9 (23,1 ng/ml; sección 2.1.). En consecuencia, se colocaron 11 g de progesterona en cada esponja con la finalidad de obtener un nivel de progesterona en plasma similar o superior al obtenido en la sección 2.1.

- ◆ *Control (n:2)*: No fueron suplementados con progesterona.

La progesterona utilizada es la descrita en la sección 2.1.4.A.

Se utilizaron esponjas de espuma de poliuretano (densidad $0,018 \text{ gr/cm}^3$) de 11 cm de diámetro y 6 cm de alto.

Para la preparación de las esponjas se procedió de la siguiente forma:

- ◆ *E6*: La progesterona se diluyó en cloroformo en una concentración de 0,475 g de progesterona/ml. Se aplicaron 4 ml sobre la superficie de la esponja y se esperó a que se produjera la evaporación del cloroformo. Este proceso se repitió tres veces de manera de obtener una concentración de progesterona/esponja de 5,7 gramos.
- ◆ *E11*: Se preparó una concentración de 0,458 g de progesterona/ml de cloroformo. Se aplicaron 4 ml sobre la superficie de la esponja. Se dejó evaporar y se repitió el procedimiento en seis oportunidades, de manera de obtener una esponja con 11 gramos de progesterona.

En el momento de colocar las esponjas, a cada una de ellas se le inyectaron 2 ml de una solución de oxitetraciclina (400 mg, Terramicina LA®, Pfizer, Sanidad Animal). Fueron colocadas en vagina según la técnica descrita por Doray y otros (1989). La esponja fue recambiada en forma diaria y la última fue retirada el día 8 del ciclo estral.

En el día 9 del ciclo estral se inyectó a los animales una dosis de 500 µg de cloprostenol (CX0.1®, López & Villanueva), con la finalidad de lisar el cuerpo lúteo.

B. Estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición hormonal

Las características de los estudios ecográficos, muestreo sanguíneo, procesamiento de las muestras y medición de progesterona plasmática fueron descritas en las secciones 1.1.4.E y 2.1.4.C, con las siguientes diferencias:

Los estudios ecográficos y el muestreo sanguíneo se realizaron entre los días 2 al 10 del ciclo estral. Estas observaciones permitieron determinar el efecto de los tratamientos sobre los niveles de progesterona plasmática y sobre la dinámica folicular. Adicionalmente, se tomaron muestras diarias (de sangre y ecográficas) en los 4 o 5 días siguientes a la inyección del agente luteolítico con el objeto de confirmar la luteólisis (nivel de progesterona < 1 ng/ml de plasma) y el destino del folículo dominante presente al momento de la misma. Otra muestra (sanguínea y ecográfica) fue tomada entre los días 3 y 6 del nuevo ciclo estral con el fin de determinar la ovulación del folículo dominante presente en el momento del celo.

C. Detección de celos

Se realizó después de la segunda aplicación de prostaglandina por observación visual 2 veces por día, con una hora de duración en cada turno para determinar el día cero (día del celo) y comenzar con la distribución de los animales. A partir del día 9 del ciclo estral,

se recomenzó con la detección de celos, hasta el momento en que todos los animales lo manifestaron.

D. Análisis estadístico

Se estudió el efecto de los tratamientos sobre:

- ◆ Nivel absoluto de progesterona plasmática y área bajo la curva del día 2 al 10 del ciclo estral.
- ◆ Diámetro del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular o de aquel que seguido durante el experimento tuvo el mayor tamaño.
- ◆ Número de folículos presentes en las diferentes clases estudiadas. Para esto se adoptó la clasificación descrita en la sección 2.1.4.D.
- ◆ Tasa de crecimiento del folículo dominante que fue calculada según lo descrito en la sección 2.1.4.D.
- ◆ Día del máximo crecimiento
- ◆ Tamaño del folículo dominante en el día 7 y tamaño máximo de dicho folículo.
- ◆ Porcentajes de vacas con luteólisis y ovulación del folículo dominante.
- ◆ Relación entre el nivel de progesterona y la onda ovulatoria.

Como dato accesorio, se registró el diámetro del cuerpo lúteo del día 2 al 10 del ciclo estral. Esto se realizó para determinar si el nivel de progesterona generado por los tratamientos afectaba el desarrollo del mismo, tal cual fue observado cuando se inyectaron 600 mg de progesterona/día (Sección 2.1.)

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron según lo descrito en la sección 2.1.4.D.

En el caso del número de folículos dentro de las clases estudiadas, del diámetro de los folículos de la primera onda y del cuerpo lúteo los datos fueron transformados según la ecuación $y = \log(x+1)$ (Sokal y Rolf, 1981).

Para las variables que fueron o no repetidas en el tiempo se utilizaron los modelos descritos en la sección 2.1.4.D.

Las diferencias entre medias fueron determinadas por el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$).

Los valores son expresados como el $x \pm ee$.

Dado que la interacción tratamiento x día fue significativa para las variables nivel de progesterona plasmática, diámetro del folículo de mayor tamaño de la primera onda,

número de folículos Clase I y relación entre el nivel de progesterona y la onda ovulatoria, el efecto de los tratamientos se estudio utilizando el área bajo la curva para la primera y última variable y el valor acumulado para las restantes.

2.3.5. Resultados

A. Nivel de progesterona plasmática

Se observó un efecto significativo del tratamiento, del día y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,01$; Gráfico N°17). El tratamiento E11 tuvo el área bajo la curva de progesterona plasmática mayor que el Control ($53,3 \pm 4,7$ ng-día/ml vs. 30 ± 6 ng-día/ml; $P < 0,05$). El E6 (37 ± 3 ng-día/ml) no difirió del Control ni del E11 ($P > 0,05$).

Los tratamientos E6 y Control no difirieron estadísticamente ($P > 0,05$).

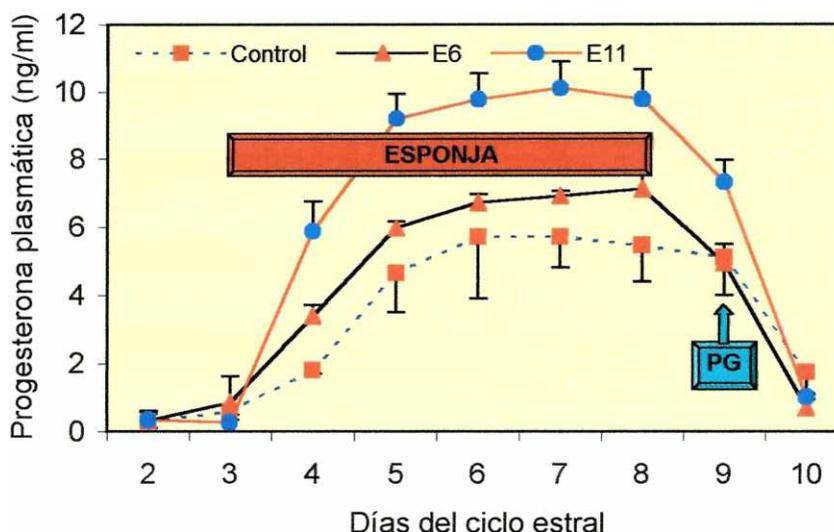


Gráfico N°17. Niveles de progesterona plasmática ($\bar{x} \pm ee$) en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponjas intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral.

Luego de retirada la esponja se produjo una disminución de los niveles de progesterona plasmática en los tratamientos respectivos y después de la inyección de $PGF2\alpha$, la disminución se produjo en los tres grupos.

Durante el celo inducido por la $PGF2\alpha$, el nivel plasmático de progesterona fue de $0,1 \pm 0,1$; no difiriendo entre tratamientos ($P > 0,05$).

B. Dinámica folicular

B.1. Folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular

Se observaron efectos del día ($P < 0,01$), del tratamiento ($P = 0,07$) y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,05$) sobre el diámetro del folículo dominante (Gráfico N°18). El diámetro acumulado del folículo dominante fue menor en el tratamiento E11 comparado con el Control ($74,7 \pm 7,0$ mm vs. 95 ± 2 mm, $P < 0,05$). Este no difirió del E6 ($86,7 \pm 3$ mm).

Luego de inyectado el agente luteolítico, el 100% de las vacas manifestaron celo a las $84 \pm 6,8$ horas, no existiendo diferencias entre tratamientos ($P > 0,05$). La ovulación del folículo dominante de la primera onda se produjo en el 50%, 100% y 33,3% de las vacas de los tratamientos Control, E6 y E11 respectivamente.

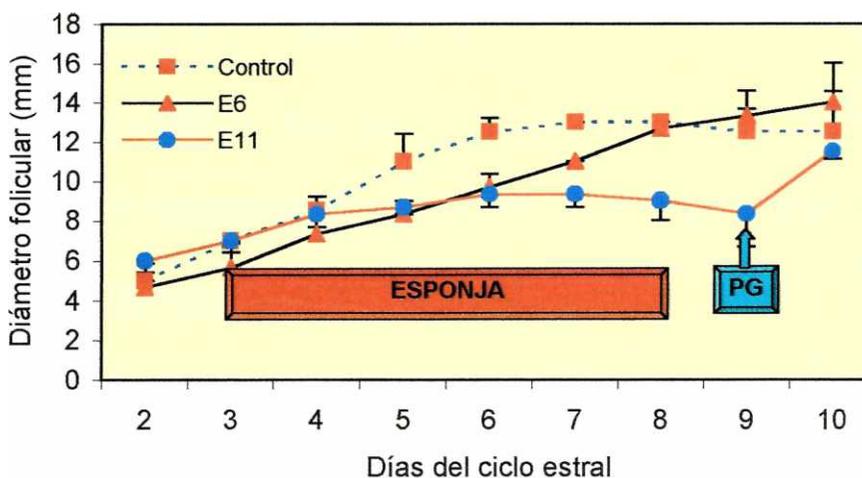


Gráfico N°18. Diámetro del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular ($\bar{x} \pm ee$) en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponja intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral.

La tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño de la primera onda de crecimiento folicular no difirió entre tratamientos (1,5; 1,3 y 0,25 mm/día; Control, E6 y E11 respectivamente; $P > 0,05$). No obstante, en el día 7, el tamaño fue menor en el tratamiento E11 comparado con el Control ($P < 0,05$) y similar al observado en el E6 (13; 10,3 y 9,3; Control, E6 y E11 respectivamente).

El diámetro máximo del folículo de mayor tamaño se obtuvo en promedio en los días 8,5 (14,5 mm), 12 (16 mm) y 8,3 (11,3 mm) para los tratamientos Control, E6 y E11 respectivamente ($P > 0,05$). En este último grupo, el promedio no es representativo de lo ocurrido en todos los animales, ya que uno de ellos obtuvo el diámetro máximo en el día 4 (9 mm) y los otros dos en los días 11 (10 mm) y 14 (11 mm).

B.2. Clases foliculares

Se observaron efectos significativos del día, del tratamiento y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,01$) sobre el número de folículos pertenecientes a la clase I (3-4 mm; Gráfico N°19). El tratamiento E11 tuvo el mayor número acumulado de folículos comparado con el E6 y Control ($132,7 \pm 9,3$; $71,7 \pm 7,4$ y $54 \pm 1,0$ respectivamente; $P < 0,01$).

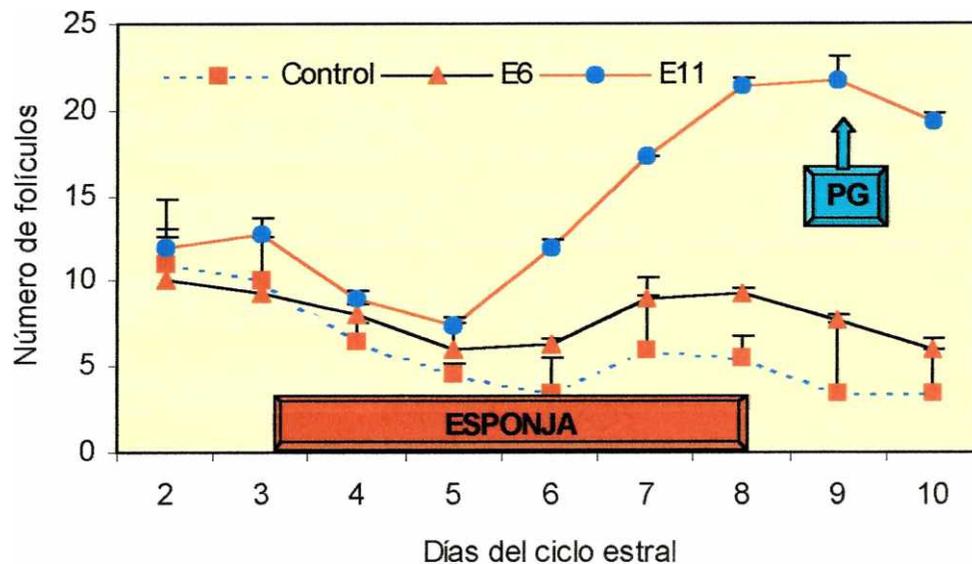


Gráfico N°19. Número de folículos Clase I (3-4 mm) en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponja intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral. Los valores se expresan como el $x \pm ee$.

Con respecto a la clase II (5-9 mm), los efectos día y tratamiento fueron significativos ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente), no así la interacción tratamiento x día ($P > 0,05$; Gráfico N°20).

El número promedio/día de folículos de 5 a 9 mm observado en el tratamiento E11 (3,4 folículos) fue mayor que el de los tratamientos Control (2,2 folículos, $P < 0,05$) y E6 (2 folículos, $P < 0,01$).

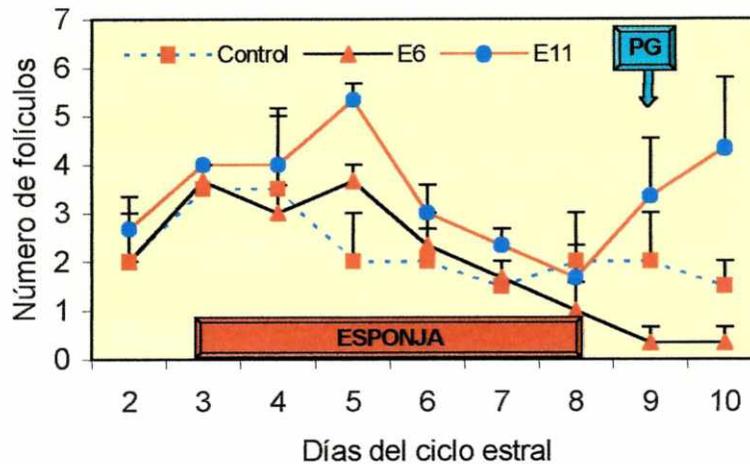


Gráfico N°20. Número de folículos Clase II (5-9 mm) en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponja intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral. Los valores se expresan como el $\bar{x} \pm ee$

Por último, en la clase III (≥ 10 mm) solo se observó un efecto del día en el número de folículos de esta clase ($P < 0,01$; Gráfico N°21).

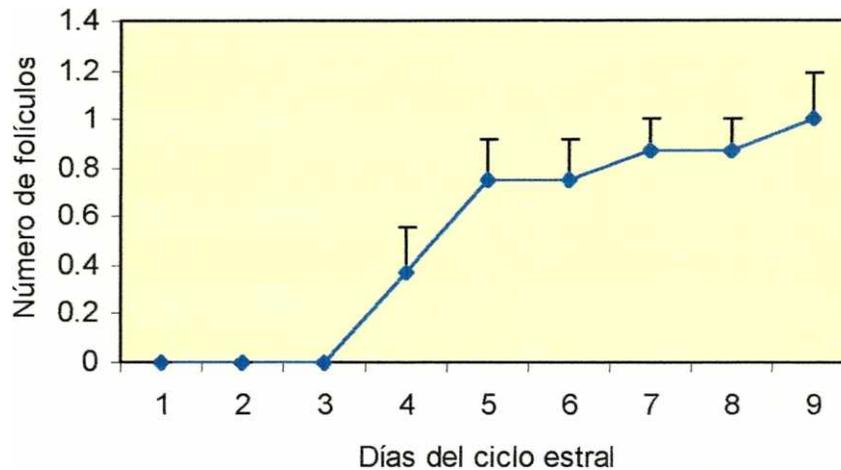


Gráfico N°21. Número promedio ($\pm e.e.$) de folículos Clase III (≥ 10 mm) en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponja intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral

C. Relación entre el nivel de progesterona y la onda ovulatoria

Se observó un efecto significativo de la interacción del día del ciclo estral x onda ovulatoria sobre el nivel de progesterona plasmática ($P < 0,05$; Gráfico N°22). Las vacas que ovularon el folículo dominante perteneciente a la primera onda de crecimiento folicular tendieron a tener una menor área bajo la curva de progesterona plasmática comparada con aquellas que ovularon el folículo dominante de la segunda onda ($35,8 \pm 3,6$ ng-día/ml vs $50,97,3$ ng-día/ml, $P = 0,08$).

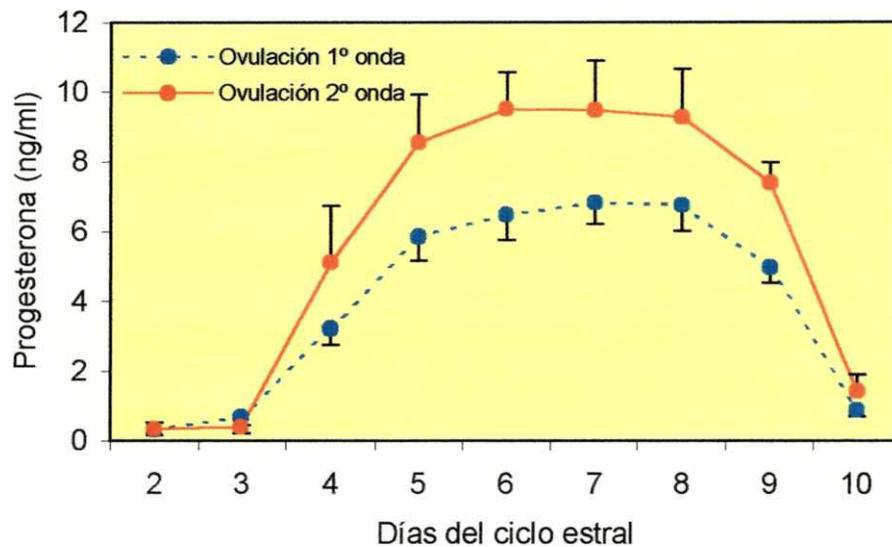


Gráfico N°22: Niveles de progesterona ($\bar{x} \pm ee$) en vacas que ovularon en la primera o segunda onda de crecimiento folicular.

D. Diámetro del cuerpo lúteo

El diámetro del cuerpo lúteo fue similar entre tratamientos ($P > 0,05$; Gráfico N°23).

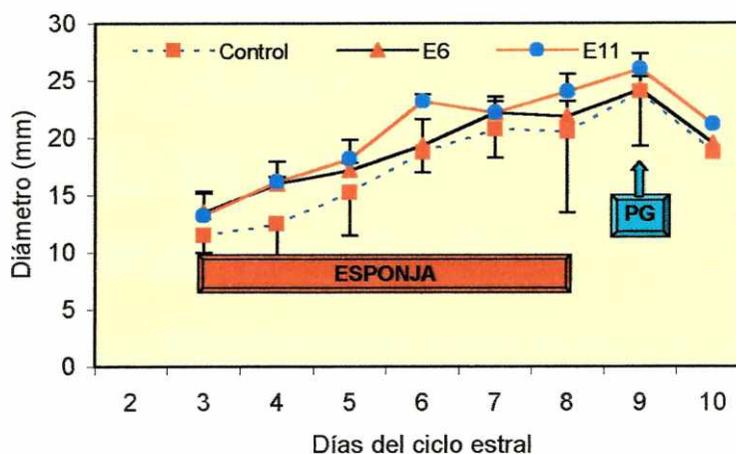


Gráfico N°23. Diámetro del cuerpo lúteo ($\bar{x}\pm ee$) del día 2 al 10 del ciclo estral en vacas Controles y en aquellas que recibieron esponja intravaginales conteniendo 5,7 g (E6) u 11 g de progesterona (E11), recambiadas diariamente, del día 3 al 7 del ciclo estral.

2.3.6. Discusión

El uso de esponjas con 5,7 g de progesterona (E6) no tuvo efecto sobre el nivel plasmático de dicha hormona comparado con el Control. La cantidad de progesterona colocada en la esponja fue el equivalente a la concentración que tienen 3 CIDR, y se esperaba un aumento en el nivel de dicha hormona tal cual lo informado por D'Occhio y otros (1997). Esta discrepancia se debería a que la absorción de la hormona proveniente de los dispositivos utilizados fue diferente e indudablemente, la absorción producida por la esponja no fue la adecuada para imitar a la lograda con el dispositivo CIDR.

El intercambiar la esponja en forma diaria (lo cual no fue realizado con el CIDR del trabajo mencionado previamente) pudo haber afectado la disolución de la hormona contenida en el dispositivo. Al retirarlas, contenían una capa blanquecina, similar a la observada al momento de la colocación; no obstante en el momento se asumió que se correspondía con el excedente de progesterona no absorbida, lo cual pudo no ser lo correcto. Además, el haber colocado la dosis total de progesterona en una sola esponja y no en tres, como en el caso de los CIDR (1,9 g cada uno) disminuyó la superficie de contacto y por ende la probabilidad de absorción de la hormona.

Cuando la concentración de progesterona/esponja aumentó a 11 g, las diferencias observadas en los niveles de progesterona plasmática con respecto al Control fueron significativas, obteniéndose niveles de $5,9\pm 0,9$ ng/ml a $10\pm 0,8$ ng/ml entre los días 4 y 7 del ciclo estral. El mayor nivel obtenido se asemeja al generado al colocar un CIDR a partir del día 8 del ciclo estral (9 a 12 mg/ml; Savio y otros, 1993a) y es inferior al obtenido por D'Occhio y otros (1997), quienes utilizaron 3 CIDR y obtuvieron una concentración de

progesterona de 14,73 ng/ml en el día 7 y al obtenido luego de inyectar 200 mg/día de progesterona a partir del día 3 del ciclo estral (Sección 2.1.) No obstante, no se puede inferir que el nivel de progesterona generado por la esponja fue equivalente al obtenido por un CIDR (Savio y otros 1993a), dado que los niveles de progesterona luego de colocar estos dispositivos son variables. Así, la utilización de 1 (Savio y otros, 1993a), 2 (Sirois y Fortune, 1990) o 3 CIDR (D'Occhio y otros 1997), generaron niveles de 9-12ng/ml, 3,7-4,9 ng/ml y 14,7 ng/ml respectivamente. Es altamente probable que diferencias en la funcionalidad del cuerpo lúteo, variación individual en la absorción de la droga o en la metodología de medición hormonal, expliquen las diferencias observadas.

El aumento del nivel de progesterona en las vacas del tratamiento E11 afectó el desarrollo del folículo dominante que se reflejó en un menor tamaño al día 7, coincidiendo con las observaciones realizadas por Adams y otros (1993a). Estos autores trataron animales con progesterona durante la fase de crecimiento del folículo dominante de la primera onda.

Con respecto a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño de los tratamientos E11 (0,25 mm/día) y Control 1,5 mm/día), se podría deber al bajo número de animales presentes en cada grupo.

La inyección de cloprostenol en el día 9 provocó una rápida disminución en el nivel de progesterona plasmática, seguida por ovulación del folículo dominante perteneciente a la primera o segunda onda de crecimiento folicular. Las vacas que ovularon el folículo dominante de la segunda onda de crecimiento folicular tendieron a tener un mayor área bajo la curva de progesterona entre los días 3 y 10 del ciclo estral que aquellas que ovularon el folículo de la primera onda. Este hecho es coincidente con lo informado por diversos investigadores, quienes han observado una relación entre el nivel de progesterona y el número de ondas de crecimiento folicular (Sirois y Fortune, 1990; Taylor y Rajamahendran, 1994). Estos últimos informaron que las vacas con dos ondas de crecimiento folicular tuvieron mayores niveles de progesterona entre los días 4 y 7 del ciclo estral (5 a 6 ng/ml) comparado con aquellas que presentaron una sola onda (< 5 ng/ml). En el presente estudio, los niveles de progesterona, entre los días 4 y 7 del ciclo estral, variaron entre $5,1 \pm 1,6$ y $9,5 \pm 1$ ng/ml para los animales con dos ondas y $3,2 \pm 0,4$ y $6,7 \pm 0,7$ ng/ml para aquellos con una onda de crecimiento.

Las causas por las cuales los niveles de progesterona afectan el desarrollo del folículo dominante son las discutidas en la sección 2.1.6. En síntesis, en las vacas con mayores niveles de progesterona, tanto un efecto sobre el eje hipotálamo hipofisiario o sobre el ovario, explicarían la regresión del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular y el surgimiento de una nueva, que culminó en la ovulación luego de inyectado el cloprostenol.

La inhibición del desarrollo del folículo dominante provocaría un aumento de los folículos pertenecientes a la clase I (3-4 mm). A partir del día 6 se observó que el folículo

dominante cesó su crecimiento y en ese momento comenzó una nueva onda de crecimiento folicular en dos tercios de los animales del grupo E11. El tercio restante, no tuvo una segunda onda de crecimiento folicular y del día 7 al 10, el folículo de la primera onda cesó su crecimiento. En este período se produjo un aumento de folículos clase I, lo que indicaría una disminución del efecto inhibitorio del folículo dominante sobre dicha clase folicular. Sin embargo, luego de inyectada la prostaglandina, este folículo comenzó a crecer y ovuló.

Con respecto a los folículos de la clase II, el tratamiento E11 tuvo un mayor número, siendo esto más notorio en el día 5, momento en el cual el folículo dominante cesó su crecimiento.

Cuando el folículo dominante deja de ejercer su efecto inhibitorio sobre el resto de la población folicular, se produce un aumento en el número de folículos de la clase I y luego de la clase II, siendo esto indicativo del desarrollo de una nueva onda de crecimiento folicular (Lucy y otros, 1992). En el presente estudio, en los días 2 y 3 el número de folículos de la clase I se encontró aumentado en los tres grupos (primera onda). A partir del día 2 aumentó la población de folículos de la clase II, en los tres grupos, disminuyendo en el día 5 en el tratamiento Control. En este momento, en dicho grupo, el folículo dominante de la primera onda estaba en pleno crecimiento inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados (5 a 9 mm). En el tratamiento E11 el folículo dominante ya no crecía y esto coincidió con el desarrollo de folículos subordinados. En los días 6-8 surgió la segunda onda de crecimiento folicular en el grupo E11 coincidiendo con un aumento en la población de folículos de la clase I y un incremento, a partir del día 9, de folículos de la clase II; en este momento comenzó a disminuir la población de folículos de la clase I.

Es llamativo el notorio incremento en la población de folículos de 3 a 4 mm ocurrido en el tratamiento E11 en el surgimiento de la segunda onda de crecimiento folicular. Una diferencia en este grupo con respecto a los demás fue la mayor área bajo la curva de progesterona plasmática. Esta mayor concentración de progesterona modificó la dinámica folicular de la primera onda de crecimiento folicular y se podría hipotetizar que ejerció un efecto sobre el ovario que afectó la próxima onda. No obstante, futuros estudios deberán analizar este aspecto con mayor profundidad.

El cambio ocurrido en la dinámica folicular en el tratamiento E11, ausencia de folículo dominante en crecimiento y un aumento en la población de folículos de 3-4 mm, plantea la posibilidad de realizar en estos animales un tratamiento superovulatorio favoreciendo la respuesta al mismo.

2.3.6. Conclusiones

- El uso de esponjas intravaginales con 11 g de progesterona y recambiadas diariamente entre los días 3 y 7 del ciclo estral, produce un cambio en la dinámica

folicular, inhibiendo el desarrollo del folículo de mayor tamaño y facilitando el aumento en la población de folículos pertenecientes a las clases 3-4 mm y 5-9 mm.

- El uso de esponjas intravaginales con 5,7 g de progesterona recambiadas diariamente entre los días 3 y 7 del ciclo estral, no produce aumento en el nivel de progesterona plasmática y en consecuencia no afecta la dinámica folicular.
- El nivel de progesterona en un ciclo corto, debido a la inyección de prostaglandina F_{2α} en el día 9 del ciclo estral, tiende a afectar el destino del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular. En los de mayor nivel, regresa y surge una nueva onda; en los otros es ovulatorio.

2.4. Efecto del nivel de progesterona plasmática modificado por esponjas intravaginales impregnadas con progesterona sobre la respuesta superovulatoria

2.4.1. Introducción

La respuesta superovulatoria es afectada por las características del folículo dominante y por el número de folículos pequeños presentes al momento de comenzar con el tratamiento superovulatorio. Nuestros trabajos anteriores y el de diversos investigadores han demostrado que la presencia de un folículo dominante en crecimiento produce efectos depresores en la respuesta al mismo (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995) y, que contrariamente un mayor número de folículos pequeños la favorece (Grasso y otros, 1989b; Romero y otros, 1991; Kawamata, 1994; Kohram y otros, 1995).

La dinámica folicular puede ser modificada por el uso de esponjas intravaginales con 11 g de progesterona, recambiadas diariamente, cuando son aplicadas entre los días 3 y 7 del ciclo estral. En el capítulo anterior se demostró que con este sistema, al día 7 se observa la ausencia de un folículo dominante en crecimiento y un aumento en la población de folículos de 3-4 mm (sección 2.3.). En consecuencia, para el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo e hipótesis:

2.4.2. Objetivo

- Estudiar el efecto de la administración de progesterona, vía esponjas intravaginales, recambiadas diariamente entre el día 3 al 7 del ciclo estral, sobre la dinámica folicular y la respuesta superovulatoria inducida con FSH-P, administrada a partir del día 7 del ciclo estral.

2.4.3. Hipótesis

- La administración de progesterona, vía esponjas intravaginales, recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral, produce un cambio en la dinámica folicular caracterizada por ausencia de folículo dominante en crecimiento lo cual posibilita una respuesta superovulatoria caracterizada por un mayor número de cuerpo lúteo y embriones que el tratamiento realizado en animales sin tratamiento con progesterona.

2.4.4. Materiales y métodos

A. Lugar, animales experimentales y tratamientos

El lugar es el indicado en la sección 1.1.4.A.

Se utilizaron 19 vacas Aberdeen Angus, con ciclos estrales regulares previos y una condición corporal $7,5 \pm 0,09$ ($\bar{x} \pm e.e$; escala de 1 a 9, 1: excesivamente flaca, 9: excesivamente gorda; Richards y otros, 1986).

El ciclo estral de los animales fue sincronizado según lo indicado en la sección 1.1.4.A.

Las vacas fueron distribuidas según un diseño completamente aleatorizado en dos grupos correspondientes a dos tratamientos:

- ◆ *E11 (n:10)*: Esponja intravaginal con 11 g de progesterona preparada según lo descrito en la sección 2.3.4.A. Las esponjas fueron colocadas a partir del día 3 y recambiadas todos los días hasta el día 8 en que se retiró la última. A partir del día 7 comenzó el tratamiento de estimulación ovárica.

Se fijó como día de inicio del tratamiento de estimulación ovárica el día 7 del ciclo estral, basado en lo observado en la sección 2.3, en que se determinó la ausencia de un folículo dominante en crecimiento y un aumento en el número de folículos de 3 a 4 mm de diámetro en dicho día.

- ◆ *Control (n: 9)*: Tratamiento de estimulación ovárica a partir de los días 8/9 del ciclo estral.

El tratamiento de estimulación ovárica fue realizado según lo descrito en la sección 2.2.4.A.

B. Detección de celos y servicios

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.B.

C. Respuesta superovulatoria

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.C.

D. Recolección y evaluación de embriones

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4. D

E. Estudios ecográficos, muestreos sanguíneos, procesamiento de las muestras y medición hormonal

Las características de los estudios ecográficos, muestreos sanguíneos, procesamiento de las muestras y medición de progesterona plasmática son las descritas en la sección 2.1.4.B, con las siguientes diferencias:

Los estudios ecográfico se realizaron en los 3 y 4 días precedentes al comienzo de la estimulación ovárica en los tratamientos Control y E11 respectivamente; y una nueva ecografía en el momento de recolección de embriones.

El muestreo sanguíneo se realizó en ambos tratamientos, en forma diaria, por punción yugular desde el día 3 del ciclo estral hasta el momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica. Posteriormente se tomó una muestra en el momento del celo. Cuando el muestreo coincidió con un estudio ecográfico, la extracción de sangre se hizo previamente.

F. Nivel de progesterona y respuesta superovulatoria

Se encuentra descrito en la sección 1.1.4.F.

G. Análisis estadísticos

Para realizar el análisis estadístico, se estudio:

1) El efecto de los tratamientos sobre:

- ◆ Nivel absoluto de progesterona plasmática del día 3 al momento de comenzar con el tratamiento superovulatorio y área bajo la curva del nivel de progesterona plasmática del día 3 al 7 del ciclo estral.
- ◆ Diámetro del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular o de aquel que seguido durante el experimento tuvo el mayor tamaño.
- ◆ Tasa de crecimiento del folículo dominante de la primera onda. La misma se calculó teniendo en cuenta la diferencia entre el diámetro folicular entre los días 7 y 3 (E11; Taylor y Rajamahendran, 1994), 7 y 5 (Control, superovulados a partir del día 8) o 7 y 6 (Control, superovulados a partir del día 9), dividido por el número de días entre mediciones.

- ◆ Tamaño del folículo dominante al día 7.
 - ◆ Número de folículos presentes en las diferentes clases estudiadas. Para esto se adoptó la clasificación descrita en la sección 2.1.4.C.
 - ◆ Porcentaje de animales que respondieron al tratamiento superovulatorio.
 - ◆ Porcentaje de animales en celo post tratamiento.
 - ◆ Intervalo prostaglandina-celo.
 - ◆ Número de cuerpo lúteo (CL).
 - ◆ Número de embriones totales (ET): ovocitos + embriones recolectados.
 - ◆ Número de embriones transferibles (Etrans: GI, GII y GIII).
 - ◆ Número de embriones congelables (Econg: GI y GII).
 - ◆ Número de embriones degenerados.
 - ◆ Número de ovocitos sin fertilizar.
 - ◆ Porcentaje de embriones recuperados con relación al número de cuerpos lúteos (ET/CL*100)
 - ◆ Porcentaje de embriones transferibles con respecto a los totales (Etrans/ET*100)
 - ◆ Porcentaje de embriones congelables con respecto a los totales (Econg/ET*100)
- 2) El efecto de la presencia de un folículo dominante en crecimiento sobre la respuesta superovulatoria.
 - 3) El efecto del nivel de progesterona en el momento de aplicar los tratamientos superovulatorios sobre la respuesta al mismo.
 - 4) La población folicular al inicio del tratamiento de estimulación ovárica en ambos grupos.

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron según lo descrito en la sección 2.1.4. D.

Los modelos utilizados para las medidas repetidas o no en el tiempo son los descritos en la sección 2.1.4.D.

Los porcentajes de recuperación de embriones transferibles y congelables fueron transformados mediante la ecuación $y = \arccos \sqrt{x}$ y analizados por ANOVA (Sokal y Rolft, 1981).

Los números de folículos dentro de las clases estudiadas, el tamaño de los folículos de la primera onda, el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles, congelables, degenerados y de ovocitos sin fertilizar fueron transformados utilizando la ecuación $y = \log(x+1)$ (Sokal y Rolft, 1981).

Todos los datos se expresan como el $\bar{x} \pm e.e.$

Dado que la interacción tratamiento x día fue significativa para las variables nivel de progesterona plasmática y número de folículos Clase I, el efecto de los tratamientos se estudió utilizando el área bajo la curva para la primera variable y el valor acumulado para la restante.

2.4.5. Resultados

A. Nivel de progesterona plasmática

Se observó un efecto significativo del tratamiento, del día y de la interacción tratamiento x día ($P < 0,05$; Gráfico N°24). El área bajo la curva de progesterona plasmática al día 7 fue significativamente superior en el tratamiento E11 ($23,7 \pm 2,7$ ng-día/ml vs. $11,1 \pm 1,0$ ng-día/ml). No obstante, en 3 animales (30%) el tratamiento no tuvo efecto y el área bajo la curva del nivel plasmático de progesterona de estos animales fue inferior comparado con el resto de los animales del mismo grupo ($14,4 \pm 3,4$ vs $27,6 \pm 1,8$; $P < 0,01$; Gráfico N°25). La interacción tratamiento x día fue significativa $P < 0,01$.

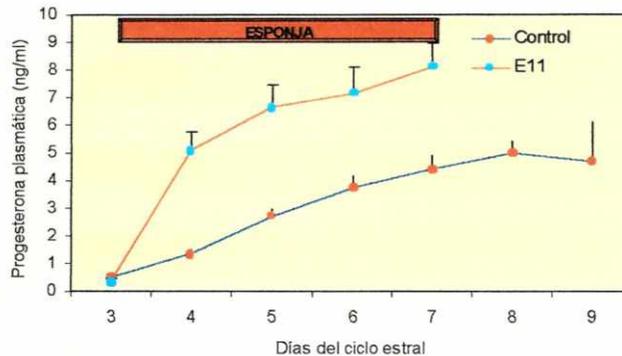


Gráfico N°24. Nivel de progesterona plasmática ($\bar{x} \pm ee$) en vacas del grupo Control y en aquellas a las que se le colocaron esponja intravaginales, recambiadas diariamente, conteniendo 11 g de progesterona (E11), del día 3 al 7 del ciclo estral.

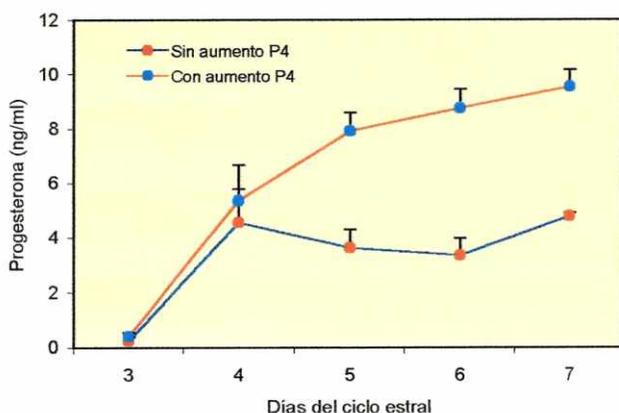


Gráfico N°25. Nivel plasmático de progesterona en vacas pertenecientes al grupo E11 que respondieron con aumento de progesterona (P4) o no luego de colocar esponja intravaginales, recambiadas diariamente, con 11 g de progesterona, del día 3 al 7 del ciclo estral.

B. Dinámica folicular

B.1. Folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular

Se observaron efectos del tratamiento y del día sobre el tamaño del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular ($P < 0,01$), no así de la interacción tratamiento x día ($P > 0,05$; Gráfico N°26).

Los folículos de mayor tamaño pertenecientes al tratamiento E11 tuvieron un diámetro promedio menor que aquellos pertenecientes al grupo Control (8,7 vs. 13,1 mm respectivamente, $P < 0,01$).

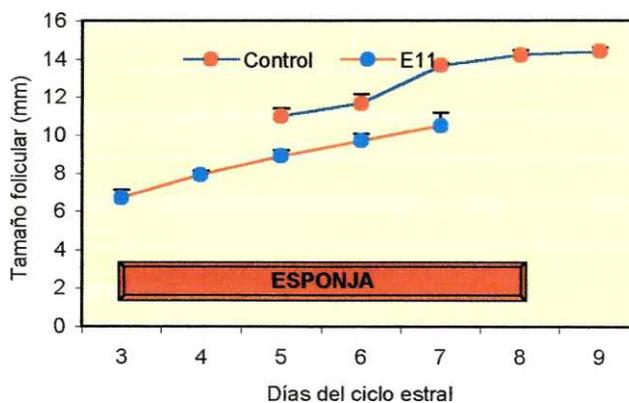


Gráfico N°26. Tamaño del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular ($x \pm ee$) en vacas del grupo Control y en aquellas a las que se le colocaron esponja intravaginales, recambiadas diariamente, conteniendo 11 g de progesterona (E11), del día 3 al 7 del ciclo estral.

La tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño fue significativamente inferior en el tratamiento E11 que en el Control (0,6 mm/día y 2,05 mm/día, E11 y Control respectivamente, $P<0,05$). Esta diferencia determinó que al día 7 del ciclo estral, los animales del Control tuvieron un mayor diámetro promedio del folículo de mayor tamaño comparado con aquellos del E11 ($P<0,01$; 13,7 mm y 10,5 mm respectivamente).

B.2. Clases foliculares

Se observaron efectos significativos del tratamiento, del día y de la interacción tratamiento x día sobre el número de folículos pertenecientes a la clase I (Gráfico N°27). Las vacas del tratamiento E11 tuvieron mayor número acumulado de dichos folículos del día 5 al 7 del ciclo estral ($P<0,05$; $55,3\pm 4,6$ vs. $36,5\pm 2,7$; E11 vs. Control).

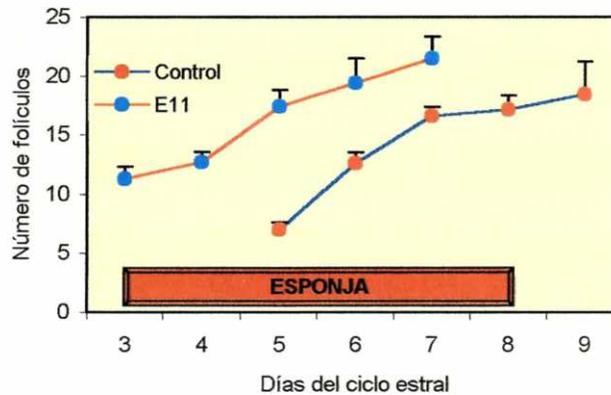


Gráfico N°27. Número de folículos Clase I (3-4 mm) en vacas del grupo Control y aquellas a las que se le colocaron esponja intravaginales, recambiadas diariamente, conteniendo 11 g de progesterona (E11), del día 3 al 7 del ciclo estral. Los valores se expresan como el $x\pm ee$.

Con respecto a los folículos de la clase II, se observaron efectos significativos del tratamiento y del día ($P<0,01$); encontrándose un mayor número de los mismos folículos en las vacas del tratamiento E11 comparada con las del Control ($2,1\pm 0,2$ y $3,5\pm 0,3$; Control y E11 respectivamente; Gráfico N°28).

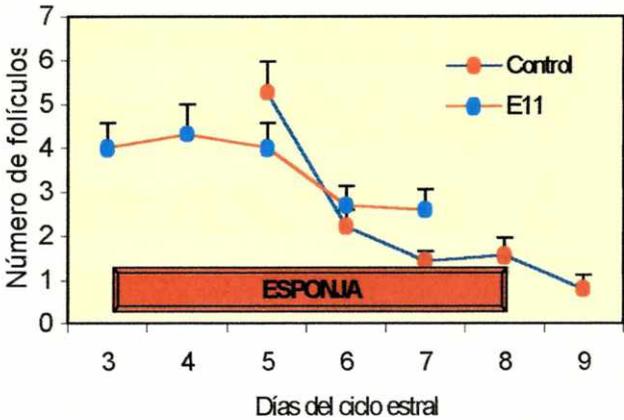


Gráfico N°28. Número de folículos Clase II (5-9 mm) en vacas del grupo Control y aquellas a las que se le colocaron esponja intravaginales, recambiadas diariamente, conteniendo 11 g de progesterona (E11), del día 3 al 7 del ciclo estral. Los valores se expresan como el $\bar{x} \pm ee$.

Por último, se observaron efectos significativos del tratamiento ($P < 0,01$) y del día ($P < 0,01$) sobre el número de folículos de la clase III (Gráfico N°29). El tratamiento Control presentó el mayor número de dichos folículos (C: 1, E11: 0,24, $P < 0,01$)

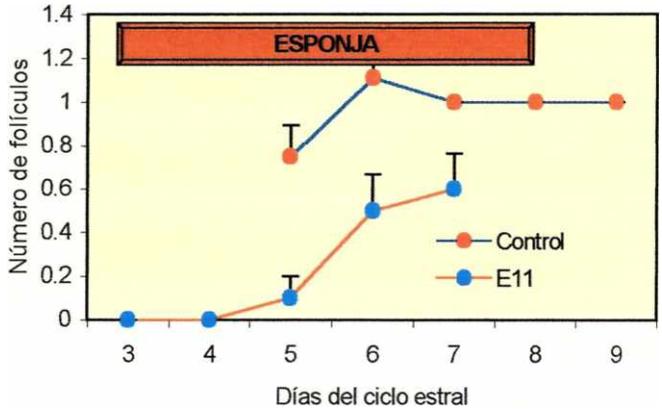


Gráfico N°29. Número de folículos pertenecientes a la clase III (≥ 10 mm) en vacas del grupo Control y aquellas a las que se le colocaron esponja intravaginales, recambiadas diariamente, conteniendo 11 g de progesterona (E11), del día 3 al 7 del ciclo estral. Los valores se expresan como el $\bar{x} \pm ee$. Efecto tratamiento: $P < 0,01$.

D. Respuesta superovulatoria

D.1. Porcentaje de vacas con respuesta

No se observaron diferencias en el porcentaje de vacas que respondieron al tratamiento superovulatorio (100% y 70,0% para los grupos Control y E11 respectivamente, $P>0,05$).

D.2. Celo post tratamiento e intervalo prostaglandina-celo

El 100% de los animales presentaron celo posterior al tratamiento de estimulación ovárica.

No se observaron diferencias en el intervalo prostaglandina-celo entre las vacas Controles y las del tratamiento E11 ($48,6\pm 0,5$ hs y 48 ± 0 hs respectivamente, $P>0,05$) y entre los animales con o sin respuesta superovulatoria ($48,4\pm 0,4$ y 48 ± 0 hs respectivamente). Además, la interacción tratamiento x respuesta no fue significativa ($P>0,05$).

D.3. Cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables

Las vacas del tratamiento Control tendieron a tener un mayor número de cuerpos lúteos, embriones totales y congelables que las del grupo E11 ($P<0,10$). En el caso de los embriones transferibles, las diferencias fueron significativas ($P<0,05$; Cuadro N°19).

Cuadro N°19. Número de cuerpo lúteos (CL), y de Embriones totales (ET), transferibles (Etrans) y congelables (Econg) en vacas de los grupos Control (C) y E11 (recibieron 11 g de progesterona, vía esponjas intravaginales, recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $x\pm ee$.

Tratamientos	CL	ET	Etrans	Econg
C	$9,7\pm 1,7^a$	$8,0\pm 2,0^a$	$6,4\pm 1,5^a$	$5,7\pm 1,5^a$
E11	$6,2\pm 1,5^b$	$3,6\pm 1,3^b$	$2,8\pm 1,3^c$	$2,8\pm 1,3^b$

Valores con superíndices diferentes en una misma columna difieren: a,b: $P<0,10$; a,c: $P<0,05$

Cuando en el tratamiento E11 no se consideraron los animales en los que el tratamiento no provocó un incremento en los niveles plasmáticos de progesterona (Cuadro N°20), las diferencias en el número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables no fueron significativas ($P>0,05$).

Cuadro N°20. Número de cuerpo lúteos (CL), y de embriones totales (ET), transferibles (Etrans) y congelables (Econg) en vacas del grupo Control (C) y en aquellas vacas del tratamiento E11 que respondieron con un aumento en los niveles de progesterona (recibieron 11 g de progesterona, vía esponjas intravaginales, recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $x \pm ee$.

Tratamientos	CL	ET	Etrans	Econg
C	9,7±1,7 ^a	8,0±2,0 ^a	6,4±1,5 ^a	5,7±1,5 ^a
E11	8,3±0,7 ^a	5,1±1,0 ^a	4,0±1,1 ^a	4,0±1,1 ^a

Los porcentajes de embriones recolectados, transferibles y congelables no difirieron entre los tratamientos E11 y Control ($P > 0,05$; Cuadro N°21).

Cuadro N°21. Porcentajes de embriones recolectados, de embriones transferibles (Etrans) y de embriones congelables (Econg) en vacas Control y E11 (recibieron 11 g de progesterona, vía esponjas intravaginales, recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral). Los valores se expresan como el $x \pm ee$.

Tratamientos	% de E. Recolectados	% de Etrans	% de Econg
Control	79,1±10,6	83,2±4,6	70,5±5,6
E11	42,9±8,4	83,3±8,6	83,3±8,6

D.4. Embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar

Los animales pertenecientes al Control tuvieron un mayor número de embriones degenerados que aquellos del E11 ($P < 0,05$; $1,1 \pm 0,3$ y $0,1 \pm 0,1$ respectivamente).

El número de ovocitos sin fertilizar fue similar entre los tratamientos estudiados (Control: $0,4 \pm 0,4$; E11: $0,7 \pm 0,9$; $P > 0,05$).

D.5. Efecto del estadio del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria

En el tratamiento Control, ninguna de las hembras tuvo un folículo dominante en crecimiento al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio. Por el contrario, en el grupo E11, en 3 animales (30%), se observó la presencia de dicho folículo. Estos presentaron un menor número de cuerpo lúteos ($P < 0,01$), de embriones totales ($P < 0,01$), transferibles y congelables ($P < 0,05$) que las vacas del tratamiento E11 sin folículo dominante ($P < 0,05$; Gráfico N°30). Los tres animales del grupo E11 que tuvieron un folículo dominante en fase de crecimiento fueron aquellos en los que el tratamiento E11 no provocó un aumento en los niveles plasmáticos de progesterona (Gráfico N°24).

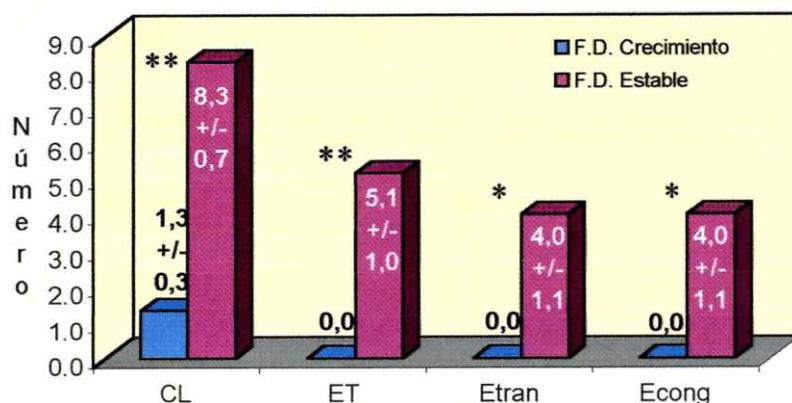


Gráfico N°30. Número de cuerpos lúteos (CL), de embriones totales (ET), transferibles (Etrans) y congelables (Econg) según las donantes tuviesen el folículo dominante en fase de crecimiento o meseta al inicio del tratamiento superovulatorio en el grupo E11. Dentro de cada variable, difieren: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

D.6. Efecto del nivel de progesterona plasmático al inicio del tratamiento superovulatorio sobre la respuesta al mismo.

En el tratamiento Control, no se observó efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo. Por el contrario, en el grupo E11 los animales con un nivel plasmático de progesterona menor a 5 ng/ml tuvieron una respuesta superovulatoria inferior a la de aquellos con un nivel superior (Cuadro N°22).

Cuadro N°22. Efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo.

Grupos	Progesterona	CL	ET	Etrans	Econg	Edeg	Ovo
Control	≥ 5 ng/ml	9,8±0,9	6,8±2,5	5,8±2,3	4,8±1,8	1±0,4	0±0
	< 5 ng/ml	9,6±2,9	9,0±3,2	7,0±2,2	6,4±2,3	1,2±0,5	0,8±0,7
E11	≥ 5 ng/ml	8,3±0,7 ^a	5,2±1,0 ^a	4,0±1,1 ^c	4,0±1,1 ^c	0,1±0,1	1,0±1,0
	< 5 ng/ml	1,3±0,3 ^b	0±0 ^b	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0	0±0

Referencias : ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables. Edeg: Embriones degenerados. Ovo: Ovocitos sin fertilizar. Valores con letras distintas en una misma columna dentro de cada grupo difieren: a,b ($P > 0,01$); c,d ($P < 0,05$).

E. Población folicular al inicio del tratamiento de estimulación ovárica

La población folicular de las clases I, II y III al inicio del tratamiento de estimulación ovárica, no difirió entre tratamientos ($P > 0,05$; Gráfico N° 34).

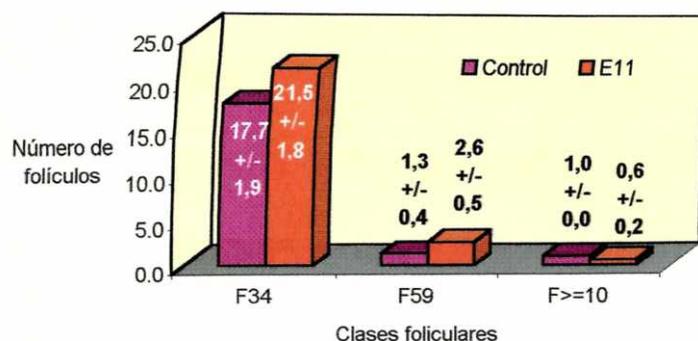


Gráfico N°34. Número de folículos clases I (3-4 mm), II (5-9 mm), III (≥ 10 mm) al inicio del tratamiento de estimulación ovárica en vacas de los tratamientos Control y E11 (recibieron progesterona vía esponjas intravaginales).

2.4.6. Discusión

La administración de progesterona mediante el uso de esponjas intravaginales provocó un aumento en el nivel plasmático de dicha hormona. No obstante cuando se analizaron los animales individualmente, se observó que en tres de ellos, los niveles aumentaron transitoriamente en el día 4 y posteriormente fueron similares a los de aquellos que no recibieron tal dispositivo.

No se puede explicar lo sucedido con las vacas en las cuales el dispositivo intravaginal no tuvo efecto, ya que los mismos fueron preparados y manipulados de la misma forma y no se observaron particularidades en vagina que permitieran hipotetizar algún problema diferencial de absorción. Además en el trabajo realizado previamente (Sección 2.3.), se utilizó el mismo dispositivo, con un aumento en los niveles de progesterona plasmática en el 100% de los animales. Esto dio base a plantear a la esponja como adecuada para modificar los niveles plasmáticos de dicha hormona.

No considerando los animales en los que el dispositivo intravaginal no tuvo efecto, el nivel de progesterona obtenido es coincidente con lo descrito en la sección 2.3. Los niveles de progesterona aumentaron a 5,4 ng/ml en el día 4 para llegar a un máximo de 9,6 ng/ml en el día 7. En la sección 2.3. los niveles fueron de 5,8 y 10,1 respectivamente.

En los animales en los que la esponja provocó un aumento en los niveles plasmáticos de progesterona, se afectó la tasa de crecimiento del folículo dominante y en consecuencia su diámetro, tal como fue mostrado en el trabajo previo (sección 2.3). Algo similar ocurrió con respecto al efecto de la progesterona sobre las diferentes clases foliculares (sección 2.3.). Contrariamente, estos cambios no fueron observados en los animales en los que el dispositivo intravaginal no tuvo efecto sobre los niveles de progesterona.

El porcentaje de animales que responden a los tratamientos superovulatorios es muy variable (60 a 100%), y los resultados del presente trabajo se sitúan dentro del rango citado en la literatura (Donaldson, 1984c; Lindsell y otros, 1986; Calder y Rajamahendran, 1992; Sanchez Garcia y otros, 1992; Alvarez y otros, 1995).

Los animales pertenecientes al tratamiento Control tuvieron una muy buena producción de embriones transferibles ($6,4 \pm 1,5$), superior a la observada en los controles de los trabajos descritos en las secciones 1.1. ($4,4 \pm 0,4$) y 2.2 ($3,3 \pm 1,6$). Si bien los trabajos no se hicieron simultáneamente para que fueran totalmente comparables, se puede observar que al momento de iniciar el tratamiento de estimulación ovárica, existió un rango de 17,5% a 50% de animales con presencia de un folículo dominante en crecimiento en los controles de las secciones 1.1. y 2.1., comparado con el 0% del presente trabajo. Como es sabido la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio deprime la respuesta al mismo (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995) y plantea a este hecho como causa de las diferencias observadas. Además, es importante remarcar que lo sucedido en el tratamiento Control es llamativo, ya que lo que ocurre normalmente es que existe, en diferentes proporciones, la presencia de un folículo dominante en crecimiento al inicio del tratamiento superovulatorio. Así, D'Occhio y otros (1997) informaron un 33,3% de animales con folículo dominante en crecimiento, cuando el tratamiento de estimulación ovárica comenzó entre los días 9 y 11 del ciclo estral; siendo mayor este porcentaje (100%) cuando el tratamiento se inició en el día 6,5 (Savio y otros, 1991).

Con respecto al tratamiento E11, se observó una tendencia a tener un menor número promedio de cuerpos lúteos, embriones totales y congelables con respecto al Control; siendo significativas las diferencias observadas en el número de embriones transferibles. Estos resultados se deberían principalmente a la ausencia de respuesta superovulatoria observada en los tres animales (30%) que no respondieron al tratamiento E11 con aumento en los niveles plasmáticos de progesterona y tuvieron un folículo dominante en crecimiento al momento de realizar el tratamiento superovulatorio. De hecho, la exclusión de los mismos en el análisis estadístico determinó que las diferencias entre tratamientos no fueran significativas.

La presencia de un folículo dominante al momento de comenzar un tratamiento de superovulación ha sido relacionada negativamente con la respuesta al mismo (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995); aunque otros investigadores no han encontrado tal efecto (Wilson y otros, 1990; Maciel y otros, 1995).

El estadio de dominancia folicular ha sido definido con diferentes criterios. Lussier y otros (1995) y Maciel y otros (1995) consideraron a un folículo como funcionalmente dominante cuando tuviese más de 9 mm de diámetro y estuviese en fase de crecimiento o en los tres primeros días de la fase de meseta; mientras que Bungartz y Nieman (1994), solo lo consideran dominante cuando se encuentra en los dos primeros días de la fase de meseta. En el presente trabajo se analizaron las tres fases del desarrollo del folículo dominante (crecimiento, meseta y regresión) y solo la fase de crecimiento sería de dominancia folicular. Esta se relacionó negativamente con la respuesta superovulatoria. Se debe tener en cuenta que la dominancia morfológica (folículo mayor a 9 mm) no siempre coincide con la dominancia funcional (efecto supresor sobre los folículos subordinados). Ejemplo de esto es que el folículo dominante presente al momento de inyectar un agente luteolítico puede ovular (Kastelic y otros, 1990; Driancourt y otros, 1991) o regresar y surgir una nueva onda de crecimiento folicular del cual se origina el folículo ovulatorio (Lavoie y Fortune, 1990; Fortune y otros, 1991). En ambos casos, tenemos un folículo morfológicamente dominante; pero, solo en el primero lo sería funcionalmente. Esto explicaría los diferentes resultados que han obtenido los investigadores que consideraron a una parte de la fase de meseta como criterio para definir dominancia folicular y fundamenta el criterio utilizado en el presente trabajo para definir dicha característica.

El folículo dominante en su fase de crecimiento, inhibe el desarrollo de los otros folículos (Pierson y Ginther, 1988; Sirois y Fortune, 1988; Guilbault y otros, 1991), a través de mecanismos endocrinos, parácrinos y autócrinos. Hay un aumento en la concentración de estrógenos y de inhibina que inhiben la secreción de FSH (Martín y otros, 1988), afectándose el crecimiento de los folículos subordinados y no del dominante, dado que este presenta receptores para FSH y LH en un número tal que le permite tener un menor umbral de estimulación para las gonadotrofinas (Findlay, 1986; citado por Bungartz y Niemann, 1994). En consecuencia, la forma en que el folículo dominante ejerce su efecto inhibitorio sobre la población folicular tiene clara relación con la menor respuesta observada en los animales que tuvieron este tipo de folículo al iniciar un tratamiento de estimulación ovárica (Grasso y otros, 1989b; Guilbault y otros, 1991; Huhtinem y otros, 1992; Bungartz y Niemann, 1994; Kohram y otros, 1995; Lussier y otros, 1995).

El número de embriones transferibles obtenido en los animales que no tuvieron un folículo dominante en crecimiento (5,4), es coincidente con lo informado por Bungartz y Niemann (1994) para animales con estas características. Además, se asemeja al obtenido por Caccia y otros (1999), quienes utilizaron un tratamiento hormonal

(progesterona/progestágenos y estrógenos) para controlar la dinámica folicular (5,7 embriones transferibles).

Con respecto al porcentaje de embriones transferibles, es coincidente con lo informado por Gonzalez y otros (1990) y Breuel y otros (1991) y superior al informado por numerosos investigadores (Lopez Gatus, 1988; Blanchard y otros, 1990; Kuehner y otros, 1993; Garcia Bojalil y otros, 1994; Gong y otros, 1995; Larocca y otros, 1995; Caccia y otros, 1999).

El número de embriones degenerados fue superior en el Control comparado con el E11 y se asemeja al límite inferior citado por Sanchez Garcia y otros (1992). No obstante, otros han obtenido valores superiores (2,8 embriones degenerados, Garcia-Bojalil y otros, 1994).

En la sección 2.2. se observó que las vacas que recibieron 600 mg/día de progesterona tuvieron una población folicular muy homogénea (folículos 10-11 mm) 12 horas posteriores a la finalización del tratamiento superovulatorio. Esto pudo haber ocurrido en el tratamiento E11 y los embriones producto de la ovulación de estos folículos tendrían menores probabilidades de provenir de ovocitos envejecidos. Esto no sería el caso de las vacas Control en el que la mayor tasa de embriones degenerados podría estar relacionada con la presencia de una población folicular heterogénea existente al momento del pico preovulatorio de LH. En consecuencia, se generaron embriones a partir de ovocitos tal vez ya envejecidos (activados) lo cual incidiría sobre la tasa de anomalías.

La relación entre el nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio y la respuesta al mismo fue variable. Así, en los animales Control no existió relación alguna; mientras que en el grupo E11 los animales con progesterona plasmática igual o mayor a 5 ng/ml tuvieron una respuesta superovulatoria significativamente superior a la de aquellos con un nivel inferior. Diferencias en el estadio del folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio explican dicha variabilidad. En el primer grupo (Control) no se observó la presencia de un folículo dominante en fase de crecimiento y la respuesta superovulatoria fue muy buena independientemente de la concentración de progesterona plasmática. Por el contrario, los animales del grupo E11 que tuvieron un nivel de progesterona menor a 5 ng/ml presentaron en una 100% un folículo dominante en fase de crecimiento y una pobre respuesta superovulatoria. Este no fue el caso de los animales con progesterona igual o mayor a 5 ng/ml quienes tuvieron el folículo dominante en fase de meseta. En consecuencia dependiendo del estadio en que se encuentre el folículo dominante serán las diferencias observadas en la respuesta superovulatoria y explican gran parte del efecto del nivel de progesterona al inicio del tratamiento de estimulación ovárica sobre la respuesta al mismo.

Por último, el intervalo prostaglandina-celo registrado en los animales superovulados se encuentra en el rango citado en la bibliografía (Seidel y otros, 1978 citado por Canseco

y otros, 1982; Mac Gowan y otros, 1985; Lindsell y otros, 1986; Lopez Gatius y otros, 1988; Larocca y otros, 1989).

2.4.7. Conclusiones

➤ El tratamiento superovulatorio iniciado en el día 7 en vacas que recibieron progesterona, vía esponjas intravaginales (11 g), recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral, no mejora la respuesta superovulatoria que se obtiene en animales sin tratamiento de progesterona y con ausencia de folículo dominante en crecimiento.

Además, se confirmó lo observado en la sección 2.3., en que la administración de progesterona, vía esponjas intravaginales (11 g), recambiadas diariamente del día 3 al 7 del ciclo estral, provoca:

- Un control de la dinámica folicular en aquellos animales con niveles plasmáticos de progesterona superiores a 5 ng/ml a partir del día 5 del ciclo estral. El folículo dominante tiene una menor tasa de crecimiento y un menor tamaño al día 7.
- Un aumento en la población de folículo de 3 a 4 mm (Clase I) y de 5 a 9 mm (Clase II).

IV. Aportes de la tesis y prospectiva

1. Gonadotropinas y superovulación

La combinación de dosis reducida de FSH-P y de eCG administradas en un mismo momento permitieron obtener una respuesta superovulatoria equivalente a aquella observada luego de utilizar el tratamiento tradicional de FSH-P (inyecciones cada 12 horas durante 4 días) (Cuadro N°23). Esta respuesta fue el resultado del efecto asociado de ambas gonadotropinas y no de una de ellas en particular (Cuadro N°24).

Cuadro N°23. Producción de embriones en hembras tratadas con FSH-P o FSH-P+eCG ($\bar{x}\pm e.e.$)

Tratamientos	ET	Etrans	Econg
FSH-P ¹	5,5±0,5	4,4±0,4	3,2±0,5
FSH-P+eCG ²	4,5±0,7	3,8±0,6	2,6±0,4

Referencias: ET: Embriones Totales. Etrans.: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.

¹30-34 mg de FSH-P, según se tratara de vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en dosis decrecientes por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días.

²5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

Cuadro N°24. Producción de embriones en hembras tratadas con dosis reducidas de FSH-P y de eCG ($\bar{x}\pm e.e.$).

Tratamientos	ET	Etrans	Econg
½ FSH-P ¹	0,06±0,06 ^a	0,06±0,06 ^a	0,06±0,06 ^a
½ eCG ²	0,7±0,4 ^a	0,3±0,2 ^a	0,1±0,1 ^a
FSH-P+eCG ³	6,3±0,7 ^b	4,3±0,5 ^b	3±0,4 ^b

Referencias: ¹5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente.

²1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

³5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: P<0,01

Por otro lado, la disminución en el número de inyecciones de FSH-P a una sola administración utilizando un medio de liberación lenta (PVP) no fue efectiva para obtener una respuesta superovulatoria (Cuadro N°25), descartando el uso de este tratamiento en los trabajos de transferencia embrionaria.

Cuadro N°25. Producción de embriones en hembras tratadas con FSH-P administrada en múltiples inyecciones o en una única vez (x±e.e.)

Tratamientos	ET	Etrans	Econg
FSH-P ¹	5,5±0,5 ^a	4,4±0,4 ^a	3,2±0,5 ^a
FSH-P PVP ²	0,7±0,4 ^b	0,3±0,2 ^b	0,2±0,1 ^b

Referencias: ET: Embriones Totales. Etrans.: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.

¹30-34 mg de FSH-P, según se tratara de vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en dosis decrecientes por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días.

²30-34 mg de FSH-P, según sean vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en una única aplicación, por vía intramuscular, disuelto en polivinil pirrolidona.

^{a,b}Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente (P<0,01).

Trabajos futuros permitirán determinar el beneficio de utilizar el tratamiento que combina dosis reducidas de FSH-P y de eCG en animales Cebuinos y sus cruza en los que al utilizar esta forma de administración se disminuye el estrés ocasionado por los numerosos encierres que se deben realizar para administrar el tratamiento de FSH-P con múltiples inyecciones.

2. Dinámica folicular y Progesterona

La dinámica folicular fue modificada al aumentar artificialmente los niveles de progesterona en plasma. Así, inyecciones diarias por vía intramuscular de 200, 400 o 600 mg de progesterona del día 3 al 9 del ciclo estral deprimieron la tasa de crecimiento del folículo de mayor tamaño y aumentaron el número de folículos de 3 a 4 mm de diámetro (Clase I). La dosis más alta generó niveles superiores a 15 ng/ml a partir del día 5 del ciclo estral, y afectó además de la dinámica folicular el desarrollo del cuerpo lúteo.

La administración de progesterona por vía intravaginal mediante el dispositivo esponja del día 3 al 7 del ciclo estral, no fue adecuada. Se requirieron altas dosis de dicha hormona (11 g/esponja) para obtener un nivel plasmático de progesterona significativamente superior a una fase luteal normal y el aumento en la concentración hormonal no se observó en el 100% de los animales tratados. No obstante, en aquellos animales con niveles de progesterona aumentado se produjo inhibición del desarrollo

del folículo de mayor tamaño y un aumentó en el número de folículos de 3 a 4 mm y de 5 a 9 mm de diámetro.

3. Dinámica folicular, progesterona y superovulación

En todos los ensayos realizados, la presencia de un folículo dominante en crecimiento al inicio de un tratamiento superovulatorio afectó negativamente la respuesta al mismo (Cuadro N°26).

Cuadro N°26. Número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables según el estado del folículo dominante al momento de realizar diferentes tratamientos superovulatorios ($\bar{x} \pm e.e.$).

Tratamiento	FD	CL	ET	Etrans	Econg
FSH-P ¹ y FSH-P + eCG ²	C	2±0,7 ^b	1,2±1,1 ^b	0,8±1 ^b	0,4±0,5 ^b
	M+R	8,3±0,3 ^a	6,3±0,3 ^a	5,2±0,2 ^a	3,7±0,3 ^a
FSH-P + eCG ²	C	4,3±0,3 ^c	3,0±0,0 ^a	2,0±0,0 ^a	1,0±0,2 ^a
	M+R	8,7±0,5 ^d	7,4±0,4 ^b	5,1±0,3 ^b	3,7±0,2 ^b
Foltropin V ³	C	2,2±0,1 ^a	1±0,4 ^a	0,4±0,2 ^a	0,4±0,2 ^a
	M+R	7,7±0,8 ^b	6,5±1 ^b	5,2±1 ^b	4,7±1 ^b
Foltropin V ⁴ + E11 ⁵	C	1,3±0,3 ^a	0 ^a	0 ^c	0 ^c
	M+R	8,3±0,7 ^b	5,1±1,0 ^b	4,0±1,1 ^d	4,0±1,1 ^d

Referencias: FD: Estado del folículo dominante. C: Crecimiento, M: Meseta, R: Regresión.

CL: Cuerpo lúteo. ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.

¹30-34 mg de FSH-P, según se tratara de vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en dosis decrecientes por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días a partir del día 10 a 12 del ciclo estral.

²5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

³400 mg de NIH-FSH-P1 administrados cada 12 horas durante 4 días (20 mg/día) a partir del día 7 del ciclo estral.

⁴400 mg de NIH-FSH-P1 administrados cada 12 horas durante 4 días (20 mg/día) a partir del día 8 o 9 del ciclo estral.

⁵E11: Esponja intravaginal con 11 g de progesterona colocadas a partir del día 3 y recambiadas todos los días hasta el día 8 en que se retiró la última.

Valores con letras distintas en una misma columna dentro de cada tratamiento superovulatorio difieren, a,b: P<0,01; c,d: P<0,05.

La superovulación de vacas en las que se realizaron tratamientos para controlar la dinámica folicular mediante la suplementación con progesterona por vía de inyecciones intramusculares o de esponjas intravaginales produjo resultados variables. En el primer caso, se observó una respuesta folicular a las 12 horas de finalizado el tratamiento superovulatorio más homogénea (folículos de 11 a 12 mm de diámetro) y de mayor magnitud que la observada en los animales que no recibieron progesterona. Esta respuesta es explicada por la ausencia de un folículo dominante en crecimiento y por un aumento en el número de folículos de 3 a 4 mm en el día de inicio del tratamiento de

estimulación ovárica. No obstante, la vía en que fue administrada la progesterona hizo que los niveles plasmáticos de dicha hormona (>1 ng/ml) se mantuvieran por un período prolongado luego de la última administración lo que provocó ausencia de ovulación.

En el segundo caso (esponjas intravaginales), la respuesta superovulatoria fue inferior a la observada en los animales no suplementados con progesterona (Control). Dos hechos explican este resultado: 1) Las esponjas no fueron efectivas en el 100% de los animales; por lo tanto, en algunos animales el nivel de progesterona no fue aumentado al punto de modificar la dinámica folicular. En consecuencia, en estos animales se observó la presencia de un folículo dominante en crecimiento y una menor respuesta superovulatoria. 2) Ausencia de un folículo dominante en crecimiento en la totalidad de los animales Control que permitieron obtener una muy buena respuesta superovulatoria. Este grupo se comportó como si los animales hubieran sido sometidos a un tratamiento de control de la dinámica folicular.

Por último, el nivel de progesterona al inicio del tratamiento superovulatorio tuvo un efecto variable sobre la respuesta al mismo. En los experimentos 1.1, 1.2 y 2.4 (grupo E11) los animales que tuvieron un nivel de progesterona igual o mayor a 5 ng/ml de plasma presentaron una mayor respuesta superovulatoria comparada con aquellos con un nivel menor. En cambio en los experimentos 2.2 y 2.4 (grupo Control) la respuesta superovulatoria fue independiente del nivel de progesterona mencionado precedentemente (Cuadro N°27).

Cuando el nivel de progesterona afectó la respuesta al tratamiento superovulatorio, el grupo de animales con nivel de progesterona igual o mayor a 5 ng/ml tuvieron en su mayoría (90,9%) la presencia de un folículo dominante en fases de meseta o regresión. En los que tuvieron un nivel de progesterona inferior, la mayoría (66,7%) tuvieron un folículo dominante en fase de crecimiento. Contrariamente, en los animales en los que no hubo efecto del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria la proporción de animales que tuvieron un folículo dominante en fase de meseta o regresión fue similar en los distintos niveles de progesterona estudiados (Cuadro N°28). Esto permite plantear que el efecto del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria depende de la dinámica folicular al inicio del tratamiento superovulatorio.

Cuadro N°27. Número de cuerpos lúteos, embriones totales, transferibles y congelables según el nivel de progesterona plasmática al día de inicio de diferentes tratamientos superovulatorios ($\bar{x} \pm e.e.$).

Experimentos	Tratamientos	P4 (ng/ml)				
		CL	ET	ETrans	ECong	
1.1	FSH-P ¹ y FSH-P + eCG ²	<5	2,9±0,8 ^a	1,7±0,6 ^a	1,2±0,5 ^a	0,7±0,3 ^a
		≥5	8±0,4 ^b	6,1±0,3 ^b	5±0,3 ^b	3,6±0,3 ^b
1.2	FSH-P + eCG ²	<5	4,6±0,4 ^a	3,6±0,5 ^a	2,4±0,4 ^a	1,4±0,4 ^a
		≥5	8,9±0,9 ^b	7,5±0,8 ^b	5,2±0,7 ^b	3,7±0,4 ^b
2.4	Folltropin V ³ + E11 ⁴	<5	1,3±0,3 ^a	0±0 ^a	0±0 ^c	0±0 ^c
		≥5	8,3±0,7 ^b	5,2±1,0 ^b	4,0±1,1 ^d	4,0±1,1 ^d
2.2	Folltropin V ⁵	<5	3,8±0,9	2,6±1,1	2±1,1,0	1,8±0,9
		≥5	6,6±1,6	5,2±2,0	3,8±1,8	3,5±1,7
2.4	Folltropin V ⁶ (Control)	<5	9,6±2,9	9,0±3,2	7,0±2,2	6,4±2,3
		≥5	9,8±0,9	6,8±2,5	5,8±2,3	4,8±1,8

Referencias: CL: Cuerpo lúteo. ET: Embriones Totales. Etrans: Embriones transferibles. Econg: Embriones congelables.

¹30-34 mg de FSH-P, según se tratara de vaquillonas o vacas respectivamente, administrados en dosis decrecientes por vía intramuscular, a intervalos de 12 horas, durante 4 días.

²5-6 mg de FSH-P intramuscular y 10-11 mg subcutáneos, vaquillonas o vacas respectivamente más 1000 UI o 1250 UI de eCG, vía subcutánea, vaquillonas o vacas respectivamente.

³400 mg de NIH-FSH-P1 administrados cada 12 horas durante 4 días (20 mg/día) a partir del día 7 del ciclo estral.

⁴E11: Esponja intravaginal con 11 g de progesterona colocadas a partir del día 3 y recambiadas todos los días hasta el día 8 en que se retiro la última.

⁵400 mg de NIH-FSH-P1 administrados cada 12 horas durante 4 días (20 mg/día) a partir del día 7, 8 o 9 del ciclo estral.

⁶400 mg de NIH-FSH-P1 administrados cada 12 horas durante 4 días (20 mg/día) a partir del día 8 o 9 del ciclo estral.

Valores con letras distintas en una misma columna difieren significativamente: a,b (P<0,01); c,d (P<0,05).

Efecto significativo del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria

Ausencia de efecto del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria

Cuadro N°28. Efecto del nivel de progesterona sobre la respuesta superovulatoria y su relación con el porcentaje de los diferentes estadios del folículo dominante al inicio del tratamiento de estimulación ovárica.

Efecto del nivel de progesterona	Progesterona (ng/ml)	Estadios del folículo dominante (%)	
		Fase de crecimiento	Fases de meseta o regresión
Presencia	< 5	66,7	33,3
	≥ 5	9,1	90,9
Ausencia	< 5	25,0	75,0
	≥ 5	23,1	76,9

En función de los resultados obtenidos surge el diseño de futuros trabajos que permitan obtener un dispositivo intravaginal para liberar progesterona que controle adecuadamente el aporte hormonal, de manera que en el 100% de los animales se aumenten los niveles plasmáticos de progesterona y al retiro de los mismos se produzca una rápida disminución de los mismos a aquel compatible con una respuesta ovulatoria (< 1 ng/ml). Además, el nivel plasmático logrado deberá encontrarse en el rango de 15 a 25 ng/ml que es aquel observado luego de realizar inyecciones diarias de 600 mg de progesterona del día 3 al 7 del ciclo estral. Estos niveles fueron acompañados por un eficiente control de la dinámica folicular y una muy buena respuesta folicular luego de finalizado el tratamiento superovulatorio.

Sumado a lo enunciado precedentemente, la administración del tratamiento de estimulación ovárica que combina dosis reducida de FSH-P y de eCG en animales con una dinámica folicular controlada por un tratamiento hormonal se constituye en una alternativa de interés para diseñar futuras líneas de investigación.

V. Bibliografia

1. ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L. and GINTHER, O.J. (1992) Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fert.* 95: 627-640.
2. ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A. and GINTHER, O.J. (1993) Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 73: 267-275.
3. AHMAD N, TOWNSEND EC, DAILEY RA and INSKEEP, E.K. (1997) Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 13-28.
4. ALBERIO, R.; IOVANNITTI, B.; PALMA, G. and CABODEVILA, J. (1989) Evaluación de la respuesta superovulatoria de dos extractos de hipófisis con diferente proporción de FSH/LH. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9 (Supl. 1): 84.
5. ALCIVAR, A.A.; MAURER, R.R. and ANDERSON, L.L. (1984) Superovulatory responses in FSH- or Pergonal®- treated heifers. *Theriogenology* 22: 635-642.
6. ALFURAIJI, M.M.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M.; DOLMAN, D.F. and ATKINSON, T. (1989) Effect of time of administration of monoclonal anti-PMSG on superovulatory response and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 31: 165 (Abstr.).
7. ALFURAIJI, M.M.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M.; DOMAN, D.F. and ATKINSON, T. (1990) Superovulation using different doses of PMSG and monoclonal anti-PMSG in cattle. *Theriogenology* 33: 186 (Abstr.).
8. ALLEN, W.R. and MOOR, R.M. (1972) The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fert.* 29: 313-316.
9. ALVAREZ, R.H.; CARVALHO, J.B.P. and ARRUDA, R.P. (1995) Resposta ovariana de vacas Mantiqueira superovuladas na presença ou ausência de um folículo morfológicamente dominante. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 19: 187-192.
10. AMBROSE, J.D. and RAJAMAHENDRAN, R. (1995) Folitropin-V stimulated multiple follicles cannot be maintained by low progesterone in cows. *Theriogenology* 43: 158 (Abstr.).

11. ARMSTRONG, D.T. and OPAVSKY, M.A. (1986) Biological characteristics of a pituitary FSH preparation with reduced LH activity. *Theriogenology* 25: 135.
12. ARMSTRONG, D.T. and OPAVSKY, M.A. (1988) Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 39: 511-518.
13. ANDERSON, G.B. (1978) Methods for producing twins in cattle. *Theriogenology* 9: 3-16
14. BALAKRISHNAN, M.; BHASKAR, B.V.; CHINNAIVA, G.P.; ARORA, V.K.; RAMU, A. and SARMA, P.A. (1993) Total cholesterol concentration in relation to superovulatory responses in crossbred cows. *Theriogenology* 40: 643-650.
15. BELLOWS, R.; STAIGMILLER, R.; WILSON, J.Ñ.; PHELPS, D. and DARLING, A. (1991) Use of bovine FSH for superovulation and embryo production on beef heifers. *Theriogenology* 35: 1069-1082
16. BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P. and GINTHER, O.J. (1991) Continued periodic emergence of follicular waves in nonbred progesterone-treated heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 193-204.
17. BETTERIDGE, K.J.; SUGDEN, E.A.; EAGLESOME, M.D.; RANDALL, G.C.B. and MITCHELL, D. (1981/82) Plasma progesterone levels in superovulated cattle in relation to hatched embryo sized, ovulation rates and premature regression of corpora lutea. *Anim. Reprod. Sci.* 4: 207-212.
18. BLANCHARD, T.; FERGUSON, J.; LOVE, L.; TAKED, T. HENDERSON, B.; HASLER, J. and CHALUPA, W. (1990) Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51: 905-908.
19. BO, G.A.; HOCKLEY, D.; TRIBULO, H.; JOFRE, F.; TRIBULO, R.; BUSO, N.; BARTH, A.D. AND MAPLETOFT, R.J. (1991) The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 35: 186 (Abstr.).
20. BO, G.A.; BERGFELT, D.R. Y MAPLETOFOT, R.J. (1996) Manipulación de la dinámica folicular en el ganado bovino: Su aplicación en programas de transferencia de embriones. *Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal*, pp 1: 53-68.
21. BO, G.A. y MAPLETOFT, R.J. (1999) Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones. *Therios* 4: 14-27.
22. BOLAND, M.P.; MAC DONNELL, H.F.; AHMED, T.S. and REID J.F.S (1986) Use of fenprostalene in superovulated beef heifers. *Vet. Rec.* 119: 241-242

23. BOLAND, M.P.; GOULDING, D. AND ROCHE, J.F. (1991) Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35: 5-17.
24. BONO, G.; CABAI, G.; SILVESTRELLI, L. and COMIN, A. (1991) Superovulatory and endocrinological responses of Simmental cows treated either with PMSG or hMG o in combination. *Theriogenology* 35: 1179-1190.
25. BREUEL, K.F.; BAKER, R.D.; BUTCHER, R.L.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K.; DAILEY, R.A. and LERNER, S.P. (1991) Effect of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. 36: 241-255.
26. BUNGARTZ, L. and 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. Fert.* 101: 583-591
27. CABODEVILA, J. y TORQUATI, S. (1993) Superovulación. En: Palma, G.A. y Brem, G. (eds.): *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, 65-103.
28. CABODEVILA, J.; PALMA, G.; IOVANNITTI, B. and ALBERIO, R. (1989) Superovulation responses in Aberdeen Angus cows treated with different FSH-p and prostaglandins. *J. Anim. Sci* 67 (sup. 1): 377 (Abstr.).
29. CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H. y BO, G.A. (1998) Effect of different estrogen and progesterone treatments on superovulatory response in beef (*bos taurus*) cattle. XIII Reunion Anual Sociedad Brasileira de Transferencia Embrionaria. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 26: 233.
30. CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H. y BO, G. (1999) Efecto del pretratamiento con eCG en la respuesta superovulatoria de vacas de carne tratadas con CIDR-B, estrógenos y progesterona. *Resúmenes 3^{er} Simposio Internacional de Reproducción Animal*. pag 210.
31. CALDER, M and RAJAMAHENDRAN, R. (1992) Follicular growth, ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrous cycle. *Theriogenology*. 38: 1163-1174
32. CALLESEN, H.; GREVE, T. and HYTTEL, P. (1986) Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25: 71-85.
33. CALLESEN, H.; GREVE, T. and HYTTEL, P. (1987) Premature ovulation in superovulated cattle. *Theriogenology* 28: 155-166.

34. CALLESEN, H.; GREVE, T AND HYTTEL, P. (1988) Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology*. 30: 477-488.
35. CALLESEN, H.; B.A.K., A.; GREVE, T.; AVERY, B.; GOTFREDSEN, P.; HOLM, P.; HYTTEL, P.; PEDERSEN, J.O.; SCHMIDT, M.; SMITH, S. and SVANBORG, N. (1989) Use of PMSG antisera in superovulated dairy heifers. *Theriogenology* 31: 179 (Abstr.).
36. CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; BAK, A.; GOTFREDSEN, P. and HOLM, P. (1990) Preovulatory plasma estradiol-17 β concentrations and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. *Theriogenology* 34: 251-258.
37. CALLESEN, H.; BAK, A. and GREVE, T. (1992) Use of PMSG antiserum in superovulated cattle? *Theriogenology* 38: 959-968.
38. CO, R.S.; GWAZDAUSKAS, F.C., TOOLE, R.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; WHITTIER, W.D. and VINSON, W.E. (1992) A retrospective study on the effects of FSH and Prostaglandin on superovulation responses in dairy cattle. *Virginia J. Sci.* 43: 325-332.
39. CHUPIN, D. and PROCURER, R. (1982) Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle: effect of injection regime. *Theriogenology* 17: 81.
40. CHUPIN, D.; CONBARNOUS, Y. and PROCUREUR, R. (1984) Antagonistic effect of LH on FSH – induced superovulation in cattle. *Theriogenology* 21: 229.
41. CHUPIN, D.; COGNIE, Y.; COMBARNOUS, Y. and SAUMANDE, J. (1987) Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: Roche, J.F. and O'Callaghan, D. (eds.) *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 66-72.
42. CLEMENT-SENGEWALD, A.; PALMA, G. and BREM, G. (1993) Biotecnología en Producción Animal. En: Palma, G.A. y Brem, G. (eds.): *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, 13-24.
43. CRITSER, E.; CRITSER, J.; WINCH, R and EILTS, C. (1982) Efficacy of Pergonal as a superovulatory drug in cattle. *Theriogenology* 17: 83.
44. D'OCCHIO, M.J.; NIASARI-NASLAJI, A. and KINDER, J.E. (1997) Influence of varied progestogen treatments on ovarian follicle status and subsequent ovarian superstimulatory responses in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 241-253.

45. DHONDT, D.; BOUTERS, R.; SPINCEMAILLE, J.; CORY, M. and VANDEPLASSCHE, M. (1978) The control of superovulation in the bovine with a PMSG-antiserum. *Theriogenology* 9: 529-534.
46. DIELEMAN, S.J. BEVERS, M.M.; WURTH, Y.A.; GIELEN, J.T. and WILLEMSE, A.H. (1989) Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology* 31: 473-487.
47. DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. and DE LOOS, F.A.M. (1993) PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 39: 25-41.
48. DONALDSON, L.E. (1984a) The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology* 22: 97-99.
49. DONALDSON, L.E. (1984b) Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology* 22: 205-212.
50. DONALDSON, L.E. (1984c) Embryo production in superovulated cows: transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology* 21: 517-524.
51. DONALDSON, L.E. and WARD, D.N. (1986) Effect of LH on embryo production in superovulated cows. *Vet. Rec.* 119: 625-626.
52. DONALDSON, L.E. (1991) The efficacy of three superovulation regimens in cattle. *Theriogenology* 35: 195 (Abstr.).
53. DORAY, J.M.; ALBERIO, R.H.; SCHIERSMANN, G.C.S.; BUTLER, H. y TORQUATI, O. (1989) Desarrollo de un tratamiento con progesterona intravaginal para controlar celo y ovulación en bovinos de cría. I. Factores que afectan la tasa de pérdida de esponjas intravaginales. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 9(supl. 1): 85, RF7
54. DRIANCOURT, M.A.; THATCHER, W.W.; TERQUI, M. and ANDRIEU, D. (1991) Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom. Anim. Endocrinol.* 8: 209-221.
55. ELDSSEN, R.P.; NELSON, L.D. and SEIDEL, G.E. (1978) Superovulating cows with Follicle Stimulating Hormone and Pregnant Mare's Gonadotrophin. *Theriogenology* 9: 17-26.
56. FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P. and PAPA, F.O. (1995) Prevalencia de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 19: 200-211.

57. FINDLAY JK (1994) Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 127-139.
58. FORTÍN, F (1989) Sincronización de celos en bovinos con prostaglandinas. Aspectos prácticos. *CABIA* 15: 29-39.
59. FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A.M. and LAVOIR, M. (1991) Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert. Suppl* 43: 187-198
60. GARCIA-BOJALIL CM, STAPLES CR, THATCHER WW and DROST M. (1994) Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 77:2537-2548
61. GARCIA, G.; SEIDEL, G. and ELSDEN, R. (1982) Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. *Theriogenology* 17: 90 (Abstr.).
62. GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P. and KNOPF, L. (1989a) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20: 187-200.
63. GINTHER, O.J.; KNOPF, L. and KASTELIC, J.P. (1989b) Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41: 247-254.
64. GINTHER, O.J.; KNOPF, L. and KASTELIC, J.P. (1989c) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87: 223-230.
65. GONG, J.G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T.A. and WEBB, R. (1995) Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 43: 221
66. GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R. and WEBB, R. (1996) Suppression in the secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a Gonadotropin-releasing Hormone Agonist. *Biol. Reprod.* 55: 68-74.
67. GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D. and MAPLETOPFT, R.J. (1990) Superovulation of beef heifers with Folltropin. A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology.* 33: 519-529.
68. GONZALEZ-MENCIO, F.; MANNS, J. and MURPHY, B.D. (1978) FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci.* 1: 137-144.

69. GOTO, K.; NAKANISHI, Y.; OHKUTSU, S.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, M.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S. and KAWABATA, T. (1987) Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. *Theriogenology* 27: 819-826.
70. GOTO, K.; OHKUTSU, S.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, H.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S.; KAEWABATA, T.; ISHII, S.; MIYAMOTO, A.; FURUSAWA, T.; UMEZU, M. and MASAKI, J. (1988) Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology* 29: 615-629.
71. GRASSO, F.; GUILBAULT, L.A.; ROY, G.L.; MATTON, P. and LUSSIER, J.G. (1989a) The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. *Theriogenology* 31: 199 (Abstr.).
72. GRASSO, F.; GUILBAULT, L.A.; ROY, G.L. and LUSSIER, J.G. (1989b) Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 31: 1209-1220.
73. GRAY, B.W.; CARTEE, R.E.; STRIGFELLOW, D.A.; RIDDELL, M.G.; RIDDELL, K.P. and WRIGHT, J.C. (1992) The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 37: 631-639.
74. GUILBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROUILLIER, P. and MATTON, P. (1991) Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 91: 81-89.
75. HASLER, J.F.; MCCAULEY, A.D.; SCHERMERHORN, E.D. and FOOTE, R.H. (1983) Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 19: 83-89.
76. HERRLER, A.; ELASAESSER, F. and NIEMANN, H. (1990) Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 33: 415-422.
77. HERRLER, A.; ELSAESSER, F.; PARVIZI, N. and NIEMANN, H. (1991) Superovulation of sairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology* 35: 633-643.
78. HOCKLEY, D.K.; BO, G.A.; PALASZ, A.T.; DEL CAMPO, M.R. and MAPLETOFT, R.J. (1992) Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37: 224 (Abstr.).

79. HUHTINEN, M.; RAINIO, V.; AALTO, P.; BREDBACKA, P. and MAKI-TANILA, A. (1992) Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 37: 457-463.
80. IRELAND, J.J. and ROCHE, J.F. (1983). Development of non ovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112: 150-156
81. KAFI, M. and Mc GOWAN, M.R. (1997) Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 137-157.
82. KANEKO, H.; TERADA, T.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWA, Y. and IGARASHI, M. (1991) Ovarian follicular dynamics and concentrations of Oestradiol-17 β , Progesterone, Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 529-535.
83. KASIRAJ, R. MUTHA, M. RANGAREDDI, N.S. and MISRA, A.K. (1992) Superovulatory response in buffaloes following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. *Theriogenology* 37: 234 (Abstr.).
84. KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. and GINTHER, O.J. (1990) Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23: 169-180.
85. KAWAMATA, M. (1994) Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet Med Sci.* 56:965-967
86. KELLY, P.; DUFFY, P.; BAGUISI, A.; DOBRINSKY, J.R.; OVERSTROM, E.W.; DUBY, R.T.; ROCHE, J.F. and 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 (Abstr.).
87. KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F. and BOLAND, M.P. (1997) Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 1-14.
88. KNOPF, L, KASTELIC, J.P., SCHALLEMBERGER, E. and GINTHER, O.J. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.* 6: 111-119.
89. KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J. and GUILBAULT, A. (1995) Follicular status and superovulation in cattle: A field trial. *Theriogenology* 43: 252.

90. KUMMER, V.; ZRALY, Z.; HOLCAK, V.; VEZNIK, Z; SCHLEGELOVA, J. and HRUSKA, K. (1980) Superovulation in cattle: Effect of goat anti-PMSG serum. *Theriogenology* 14: 383-390 (Abstr.).
91. KUDLÁČ E.; KONECNY, J. and CERMÁK, J. (1991) Progesterone concentrations in milk of superovulated cows. *Acta Vet. Brno.* 60: 171-179.
92. KUEHNER, L.F.; RIEGER, D.; WALTON, J.S.; ZHAO, X. and JOHNSON, W.H. (1993) The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology.* 40: 5: 1003-1013
93. LAROCCA, C.E.; FERNANDEZ, A.; GONZALEZ, A.F. and CARBO, A.A. (1995) The efficiency of different gonadotrophin preparations on the superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 43: 261 (Abstr.).
94. LAROCCA, C.; CAORSI, C.; ALGORTA, M.; GARCIA PINTOS, H. y FERNANDEZ, A. (1999) Aplicación de Lutropin-V en la superovulación de vacas donantes de embriones. 3^{er} Simposio Internacional de Reproducción Animal. pag. 218.
95. LAURIA, A.; GENAZZANI, A.; OLIVA, O.; INAUDI, P.; CREMONESI F.; MONITTULA, C. and AURELI, G. (1982a) Clinical and endocrinal investigation on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 66: 219-225.
96. LAURIA, A.; OLIVA, D.; GRENAZZANI, A.R.; CREMONESI, F.; CROTTI, S. and BARBETTI, M. (1982b) Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotropin. *Theriogenology* 18: 357-363.
97. LAVOIE, M. and FORTUNE, J.E. (1990) Follicular dynamics in heifers after injection of PGF₂ α during the first wave of follicular development. *Theriogenology* 33: 270 (Abstr.).
98. LERNER, S.P.; THAYNE, W.V.; BAKER, R.D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E.K.; DAILEY, R.A.; LEWIS, P.E. and BUTCHER, R.L. (1986) Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63: 176-183.
99. LINDSELL, C.E.; MURPHY, B.D. and MAPLETOFT, R.J. (1986) Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26: 209-219.

100. LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R.; HILL, K.G. and MASSEY, J.M. (1988) Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* 29: 271.
101. LOPEZ-GATIUS, F.; CAMON-URGEL, J. and ANGULO-ASENSIO, E. (1988) Effects of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 30: 877-885.
102. LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L. and THATCHER, W.W. (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3615-3626.
103. LUSSIER J.G., MATTON P., GUILBAULT L.A., GRASSO F., MAPLETOFT R.J. and CARRUTHERS, T.D. (1994). Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular fluid treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102: 95-105.
104. LUSSIER, J.G.; LAMOTHE, P. and PACHOLEK, X. (1995) Effects of follicular dominance and different Gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 43: 270 (Abstr.).
105. MACIEL M, GUSTAFSSON H and RODRIGUEZ-MARTINEZ H (1995) Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *Zentralbl Veterinarmed A* 42:123-129
106. MANIKKAM, M. and RAJAMAHENDRAN, R. (1997) Progesterone-induced atresia of the proestrous dominant follicle in the bovine ovary: Changes in diameter, Insulin-like Growth Factor System, Aromatase activity, Steroid Hormones, and Apoptotic Index. *Biol. Reprod.* 57: 580-587.
107. MAPLETOFT, R. (1980) Effect of progestagen ear implant on superovulatory response in the cow. *Theriogenology* 13: 102 (Abstr.).
108. MAPLETOFT, R.J.; GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; MURPHY, B.D. and CARRUTHERS, T.D. (1988a) Superovulation of beef heifers with Follitropin or FSH-P. *Theriogenology* 29: 274 (Abstr.).
109. MAPLETOFT, R.J.; WU, M. and MURPHY, B.O. (1988b) Superovulation of beef cattle with Follitropin. 11th. Internat. Congress Anim. Reprod. AI, Dublin, Ireland, 173-175.
110. MAPLETOFT, R.J.; PAWLYSHYN, V.; GARCIA, A.; BO, G.A.; WILLMOTT, N.; SAUDERS, J. and SCHMUTZ, S. (1990) Comparison of four different gonadotropin treatments for inducing superovulation in cows with 1:29 translocation. *Theriogenology* 33: 282.

111. MARTIN, G.B.; MAPLETOFT, R.J.; MANNS, J. and HUMPHREY, W.D. (1988) Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotropin secretion in the ewe. *J. Reprod. and Fert.* 87: 319-328 (Abstr.).
112. MARTIN, T.L.; FOGWELL, R.L. and IRELAND, J.J. (1991) Concentrations of Inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 44: 693-700.
113. MC GOWAN, M.R.; JOHNSON, W.; MAPLETOFT, R.J. and JOCHLE, W. (1983) Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG). a dose response trial. *Theriogenology* 19: 141 (Abstr.).
114. MC GOWAN, M.R.; BRAITHWAITE, M. and JOCHLE, W. (1985.) Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): A dose response trial. *Theriogenology* 24: 173-184.
115. MIKEL-JENSON, A.; GREVE, T.; MADEJ, A. and EDQVIST, L.E. (1982) Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF₂ α treated cow. *Theriogenology* 18: 33-34 (Abstr.).
116. MISRA, A.K.; KRISHNA, K.G.; RAJASHWARAN, S.; JOSHI, B.V. and JAIWAL, R.S. (1992) Superovulatory response to single subcutaneous injection of Folltropin in Holstein and Sahiwal cows. *Theriogenology* 37: 260.
117. MONNIAUX, D. and SAUMANDE, J. (1983) Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-81.
118. MONNIAUX, D.; MARIANA, J.C. and GIBONS, W.R. (1984) Action of PMSG on follicular population in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 70: 243-253
119. MOOR, R.M.; KRUIP, TH., A.M. and GREEN, D. (1984) Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation?. *Theriogenology* 21: 103-115.
120. MOOR, R.M.; OSBORN, J.C. and CROSBY, J.M. (1985) Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 74: 167-172.
121. MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J.; MANNS, J. and HUMPHREY, W.D. (1984) Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21: 117-125.
122. MURPHY, B.D. and MARTINUK, S.D. (1991) Equine chorionic gonadotrophin. *Endoc. Rev.* 12: 27-44.

123. NAKAJIMA, A; SUZUKI, H; HIRAIZUMI, S; ONODERA, K; SENBOKU, T and DOMEKI, I. (1992). Preovulatory plasma progesterone and estradiol-17beta concentrations and superovulatory response in PMSG-treated donor cows. *Animal Science and Technology*. 63: 704-707
124. NIGRO, M.; BURRY, E.; CACCIA, M. and BO, G.A. (1999) Producción de embriones transferibles en donantes tratadas con LH porcina en la primera inseminación. 3^{er} Simposio Internacional de Reproducción Animal. pag 220.
125. OLIVERA-ANGEL, M.; VOSS, H.J. and HOLTZ, W. (1984) Recovery rate and quality of embryos collected from suckled cows and beef heifers after superovulation with PMSG. *Theriogenology* 22: 553-562.
126. OPAVSKY, M.A. and ARMSTRONG, D.T. (1989). Effect of luteinizing hormone on superovulatory and steroidogenic response of rat ovaries to infusion of follicle stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 40: 15-25.
127. ORTUNO, A.M. and CARSON, R.L. (1985) The effects of dietary monensin sodium upon superovulation and embryo viability from mature cows. *Theriogenology* 23: 743-752.
128. PALMA, G.A. (1993a) Recolección de embriones. En: *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. pag. 105-128. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina.
129. PALMA, G.A. (1993b) Evaluación morfológica de los embriones. En: *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. pag. 129-142. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina.
130. PAWLYSHYN, V.; LINDSELL, C.E.; BRAITHWAITE, M. and MAPLETOFT, R.J. (1986) Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. *Theriogenology* 25: 179 (Abstr.).
131. PETR, J.; MÍKA, J. and JÍLEK, F. (1990) The effect of PMSG-priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 33: 1161-1165
132. PETERS, K.E.; BERGFELD, E.G.; CUPP, A.S.; KOJIMA, E.N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M.E.; GROTIAN, H.E.; HAMERNIK, D.L.; KITOK, R.J. and KINDER, J.E. (1994) Luteinizing Hormone Has a Role in Development of Fully Functional Corpora Lutea (CL) But Is Not Required to Maintain CL Function in Heifers. *Biol. Reprod.* 51: 1248-1254.
133. PIERSON, R.A. and GINTHER, O.J. (1984) Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21: 495-504

134. PIERSON, R.A. and GINTHER, O.J. (1987a) Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.* 14: 165-176
135. PIERSON R.A. and GINTHER, O.J. (1987b) Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 14: 177-186.
136. PIERSON, R.A. and GINTHER, O.J. (1988) Ultrasound imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29: 21-37
137. PRADO DELGADO, A.R.; ELSDEN, R.P. and SEIDEL, G.E. (1984) Effects of GnRH on superovulated cattle. *Theriogenology* 31: 317-321.
138. PURSELEY, J.R.; STEVENSON, J.S. and MINTON, J.E. (1993) Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of Gonadotropin-Releasing Hormone at estrus. *J. Dairy Sci.* 76: 2548-2560.
139. RAJAMAHENDRAN, R. and CALDER, M.D. (1993) Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 40: 99-109.
140. RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C. and WARNER, M.B. (1986) Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62: 300-306
141. ROCHE, J.F. and BOLAND, M.P. (1991) Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology* 35: 81-90.
142. ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z. and SEIDEL, G.E. (Jr). (1991) Number of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. *Theriogenology* 35: 265 (Abstr.).
143. SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M.E.; KOJIMA, F.N.; CUPP, A.S.; BERGFELD, E.G.; PETERS, K.E.; MARISCAL, V.; KITOK, R.J. and KINDER, J.E. (1995) Dosage of the synthetic progestin, Norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17β estradiol in heifers. *Biol. Reprod.* 52: 464-469.
144. SANCHEZ-GARCIA, L.; FERNANDEZ RODRIGUEZ, M. and VALLEJO, V.M. (1992) Creation of a germplasm bank (frozen sperm and embryos) in the Morenas Gallegas cattle breeds preservation program. *Archivos de Zootecnia.* 41: 485-496.
145. SAS (1989) Institute Inc., SAS/STAT^R User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC; SAS Institute Inc., 846 pp.

146. SATOH, H.; NUMABE, T.; TAKADA, T.; OIKAWA, T.; KIFUNE, A.; WATANABE, G. and TAYA, K. (1996) Superovulation in Japanese beef cows using Polyvinylpyrrolidone (PVP) as the vehicle for Porcine FSH (pFSH). *Theriogenology* 45: 332 (Abstr.).
147. SAUMANDE, J. (1980) Concentration of luteinizing hormone, estradiol 17 beta and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 84: 425-437.
148. SAUMANDE, J.; PROCUREUR, R. and CHUPIN, D. (1984) Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology* 21: 727-731.
149. SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P. and ROCHE, J.F. (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 83: 663-671.
150. SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; HYNES, N.; MATTIACCI, M.R. and ROCHE, J.F. (1990) Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7?. *Theriogenology* 33: 677-687.
151. SAVIO, J.D.; BONGERS, H.; DROST, M.; LUCY, M.C. and THATCHER, W.W. (1991) Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. *Theriogenology* 35: 915-929.
152. SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; MORRIS, G.D.; ENTWISTLE, K. and DROST, M. (1992). Terminal follicular development and fertility in cattle is regulated by plasma progesterone. In: 12th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination 2: 999-1001.
153. SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; MORRIES, G.R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M. and MATTIACCI, M.R. (1993a) Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98: 77-84.
154. SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L. and WOLFENSON, D. (1993b) Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97: 197-203.
155. SCHALLEMBERGER, E.; ULRICH, P.; MOSTL, E.; FUCHS, S. and TENHUMBERG, H. (1994) Induction of superovulation in cattle comparing single subcutaneous and repeated injections with standard intramuscular administration of FSH. *Theriogenology* 41: 290.

156. SIROIS, J. and FORTUNE, J.E. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39: 308-317.
157. SIROIS, J. and FORTUNE, J.E. (1990) Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-925.
158. SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. (1981) *Biometry*. 2nd. ed. Freeman, W.H. San Francisco
159. SPITCER LJ and ECHTERNKAMP SE (1986) Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 62: 428-451
160. SPRINGMANN, K.; HOLTZ, W. and ZEROBIN, K. (1986) Hormonal imbalances after superovulation of beef heifers with PMSG. *Theriogenology* 25: 201 (Abstr.).
161. STAIGMILLER, R.B.; BELLOWS, R.A.; ANDERSON, G.B.; SEIDEL, G.E. JR.; FOOTE, W.D.; MENINO, A.R. JR. and WRIGHT, R.W. Jr. (1992) Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology* 37: 1091-1099.
162. STOCK, A.E. and FORTUNE, J.E. (1993) Ovarian follicular dynamics in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132: 1108-1114.
163. SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. and IRELAND, J.J. (1994) Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101: 547-555.
164. SUSUKI, T.; YAMAMOTO, M; OE, M. and TAKAGI, M. (1994) Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Vet. Rec.* 135: 41-42.
165. SZÉCHY, M.L.M. and VINHA, N.A. (1992) Efeito do tratamento hormonal sobre a taxa de recuperação embrionária em vacas superovuladas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 16: 139-147.
166. TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G. and SASAMOTO, S. (1993) Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39: 327 (Abstr.).
167. TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G. and SASAMOTO, S. (1995) Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 43: 1259-1268.

168. TAYLOR, C. and RAJAMAHENDRAN, R. (1991a) Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71: 61-68.
169. TAYLOR, C. and RAJAMAHENDRAN, R. (1991b) The effect of norgestomet and progesterone supplementation on LH release and follicular dynamics in dairy cattle. *Biol. Reprod.* 44 (Suppl.1): 56 (Abstr.).
170. TAYLOR, C. and RAJAMAHENDRAN, R. (1994) Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 281-285.
171. TAYLOR, C.; MANIKKAM, M. and RAJAMAHENDRAN, R. (1994) Changes in ovarian follicular dynamics and luteinizing hormone profiles following different progestagen treatments in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 273-279.
172. TEGEGNE, A.; FRANCESCHINI, R. and SOVANI, S. (1994) Superovulatory response, embryo recovery and progesterone secretion in Boran (*Bos indicus*) cows after treatment with either Pergovet or Pluset. *Theriogenology* 41: 1653-1662
173. TRIBULO, H.; JOFRE, F.; CARCEDO, J.; ALONSO, A.; TRIBULO, R. and BO, G.A. (1993) Superovulation in *Bos Indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39: 331 (Abstr.).
174. TURMAN, E.J.; LASTER, D.B.; RENBARGER, R.E. and STEPHENS, D.F. (1972) Multiple births in beef cows treated with Equine Gonadotropin (PMS) and Chorionic Gonadotropin (HCG) *J. Anim. Sci.* 32: 962-815
175. TURZILLO, A.M. and FORTUNE, J.E. (1990) Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fert.* 89: 643-653.
176. VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; BRADEN, T.D.; TURZILLO, A.M. and NETT, T.M. (1997) Effect of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and Follicle Stimulating Hormone, GnRH receptors, and messenger Ribonucleic acid for Gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 138: 594-601.
177. VOS, H.J.; OLIVERA-ANGEL, M. and HOLTZ, W. (1983) Superovulation in beef cattle with PMSG and prostaglandins or progestins. *Theriogenology* 20: 615-625.
178. WALSH, J.H.; MANTOVANI, R.; DUBY, R.T.; OVERSTROM, E.W.; DOBRINSKY, J.R.; ROCHE, J.F. and BOLAND, M.P. (1993) Superovulatory response in beef heifers following once or twice daily pFSH injection. *Theriogenology* 39: 335 (Abstr.).

179. WALTON, J.S. and STUBLINGS, R.B. (1986) Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 26: 167-177.
180. WANG, H.; WU, M.; XU, K.; HAGELE, W.C. and MAPLETOFT, R.J. (1987) Control of superovulation in the cow with a PMSG antiserum. *Theriogenology* 27: 291 (Abstr.).
181. WARFIELD, S.J.; SEIDEL, G.E. and ELSDEN, R.P. (1986) A comparison of two FSH regimens for superovulating cows and heifers. *Theriogenology* 25: 213.
182. WEBB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E. and MOOR, R.M. (1999). Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci.* 68: 257-284
183. WILLMOTT, N.; SAUNDERS, J.; BO, G.A.; PALASZ, A.; PIERSON, R.A.; and MAPLETOFT, R.J. (1990) The effect of FSH/LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology* 33: 347 (Abstr.).
184. WILSON, J.M.; JONES, A.L. and MILLER, D.R. (1990) Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology* 33: 349.
185. WUBISHET, A.; GRAVES, C.N.; SPAHT, S.L.; KESLER, D.J. and FAVERO, R.J. (1986) Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. *Theriogenology* 25: 423-427.
186. YADAV, M.C.; WALTON, J.S. and LESLIE, K.E. (1986) Plasma concentrations of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology* 26: 523-540.
187. YAMAMOTO, M.; OOW, M.; KAWAGUCHI, M. and SUZUKI, T. (1994) Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41: 747-755.
188. ZAORAL, J.; CRNÁVEK, B. and RÍHA, J. (1991) Selection of donors and recipients for embryo transfer on the basis of progesterone levels. *Scientia Agriculturae Bohemoslovaca* 23: 331-342.
189. ZEITOUN, M.M.; YASSEN, A.M.; HASSAN, A.A.; FATHELBAB, A.Z.; WISE, T. N. and MAURER, R.R. (1988) Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows. *Theriogenology* 29: 339 (Abstr.).
190. ZEITOUN, M.M.; YASSEN, A.M.; HASSAN, A.A.; FATHERLBAB, A.Z.; ECHTERNKAMP, S.E.; WISE, T.H. and MAURER, R.R. (1991) Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* 35: 653-667.