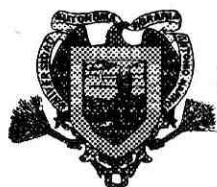


Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en vacas Holstein tratadas con anti-PMSG en la fase tardía del pico preovulatorio de LH

SERGIO IGNACIO BARRAZA ARAIZA

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el
grado de Maestro en Ciencias en Reproducción
Animal**



**Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"
Unidad Laguna-Subdirección de Postgrado
Torreón, Coahuila. Diciembre de 1997.**

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

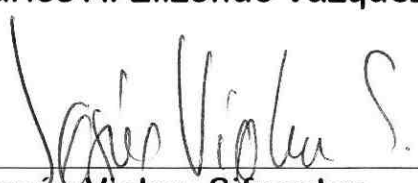

Dr. Carlos Leyva Orasma

Asesor:

Dr. Fernando U. Adame De León

Asesor:


Dr. Carlos A. Elizondo Vázquez


MC. Jesús Vielma Sifuentes.

Encargado del Área de Postgrado U.L.


Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Subdirector de Asuntos de Postgrado

Torreón, Coahuila. Diciembre de 1997.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Nuestro Señor

Por darme la dicha de la vida, la salud y la inteligencia y por permitirme culminar satisfactoriamente los objetivos que me he propuesto.

A las Instituciones:

A mi **terra mater**, que nuevamente me brinda la oportunidad de superación y crecimiento profesional e intelectual. Gracias Narro.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por su interés en la formación de profesionales que enriquezcan los conocimientos hacia el engrandecimiento de nuestro país y por su siempre oportuno apoyo.

A mis Asesores:

Dr. Carlos Leyva Orasma. Por su incondicional apoyo, por su gran paciencia y entrega, por los conocimientos que gracias a su ayuda pude adquirir, pero sobre todo, por su amistad.

Dr. Fernando Ulises Adame de León. Por su contribución en la realización de este trabajo, por la confianza que depositó en mi al ingresar a este postgrado y por el invaluable apoyo que en todo momento me brindó durante el desarrollo del mismo.

Dr. Carlos E. Elizondo Vázquez. Por su dedicación e interés en la culminación de este trabajo, por sus consejos, recomendaciones y por los conocimientos que siempre estuvo en disposición de transmitir.

A mis Maestros:

MC. Jesús Vielma Sifuentes, Dr. J. Alberto Delgadillo Sánchez, Dr. Pedro Cano Ríos, Dr. David Hernández Bustamante, M.C. Enrique Cantú Brito, MC. Sonia López. Por el interés mostrado al transmitir sus valiosos conocimientos y experiencias.

A mis Compañeros:

Américo Garza, Armando López, Benjamín Serrano, Chon Aguilar, Evaristo Carrillo, Jorge Iturbide, Malena Cortéz, Oscar Villarreal y Paty Nava. Por los momentos siempre agradables que pasé a su lado y por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis Amigos:

Víctor y Verónica, Juan Carlos y Leonor, Rubén y Nena, Chuy y Luly. Por su sincera amistad y apoyo incondicional en todo momento.

A todos quienes contribuyeron en la realización de este trabajo:

Sr. Don Salvador Alvarez (Establo El Potrero)
Sr. Don Rigoberto Becerra (Establo Providencia)
Sr. Jorge Becerra (" ")
Sr. Alfredo Becerra (" ")
Ing. Víctor Martínez R.
MVZ Ernesto Martínez
Dr. Luis Zarco (Dpto. Reproducción UNAM)
MVZ Susana Rojas (" " ")
MVZ Clara Murcia (" " ")
MVZ Jorge Iturbide
MC. Sonia López
QFB Benjamín Serrano
MVZ Concepción Aguilar
MVZ Raúl Villegas V.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis Padres:

Por que gracias a su ejemplo de amor, trabajo y honestidad, me condujeron por el camino para ser un hombre de bien.

A mi Familia:

A mi Esposa, **Marissa**. Quien en todo momento me dió su amor, apoyo incondicional y aliento para culminar los objetivos que me he trazado.

A mis Hijos. **Alejandra, Sergio Iván y Alan David**. Por ser motivo y fuente de inspiración que me obliga a la superación constante y a buscar trascender en el difícil camino de la vida.

A mi Hermana **Lupe** y a **José Juan**.

COMPENDIO

Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en vacas Holstein tratadas con anti-PMSG en la fase tardía del pico preovulatorio de LH

POR:

Sergio Ignacio Barraza Araiza

MAESTRÍA EN CIENCIAS

REPRODUCCIÓN ANIMAL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

Torreón, Coahuila. Diciembre de 1997.

Dr. Carlos Leyva Orasma-Asesor

Palabras clave: Vacas, anti-PMSG, PMSG, superovulación, transferencia de embriones, calidad embrionaria.

Con el fin de evaluar el efecto de la aplicación de un anticuerpo monoclonal (anti-PMSG) sobre la respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria se seleccionaron veintidós vacas Holstein con el tracto reproductivo normalmente cíclico en dos establos de la Región Lagunera y fueron sincronizadas con un análogo de la prostaglandina $F2\alpha$ (PG) (Prosolvín[®] Intervet) y superovuladas i.m. con 3000 UI de PMSG (Folligon[®] Intervet) el día 11 del ciclo estral (celo=día cero) seguida 48 h después de 15.00 mg de PG (Prosolvín[®]). Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción venicoccígea diariamente hasta 24 h después de la última administración de PG reduciéndose a cada 6 h hasta 8 h antes del celo esperado, a partir de ese momento se colectaron a intervalos de una

hora y hasta 10 h después del celo. Las 22 vacas fueron inseminadas a las 12 y 24 horas después del inicio del celo y se dividieron en dos grupos, 11 de ellas (grupo A) recibieron una dosis i.m. de 2.00 ml de anti-PMSG monoclonal (CIMA-Cuba) al tiempo que se realizaba la primera inseminación y las 11 restantes (grupo B) recibieron la misma dosis de anti-PMSG al momento de la segunda inseminación. Los niveles séricos de la hormona luteinizante (LH) y progesterona (P4) fueron cuantificados por radioinmunoanálisis. Retrospectivamente se determinó la relación entre el momento de la aplicación del antisuero y el pico preovulatorio de LH. Siete días después de la primera inseminación se realizó el lavado uterino para la recuperación embrionaria y los embriones obtenidos fueron evaluados y transferidos por la técnica no quirúrgica a vaquillas nulíparas previamente sincronizadas. La respuesta superovulatoria se evaluó por exploración rectal el día previo al lavado uterino. La ocurrencia del pico preovulatorio de LH se presentó con una media de 48.38 ± 2.21 h después de la PG y 2.29 ± 1.20 h después del inicio del celo para el total de las vacas. Así mismo, también en forma retrospectiva se encontró que la inyección de anti-PMSG fue a las 11.00 ± 1.85 y 20.55 ± 1.55 h después de la aparición del pico preovulatorio de LH para el grupo A y B respectivamente.

El tratamiento con anti-PMSG 24 h después del celo (Grupo B) incrementó significativamente ($P < 0.05$) la cantidad de embriones transferibles (grados 1 y 2) y la tasa ovulatoria 5.10 ± 0.54 vs 2.57 ± 0.75 y 11.25 ± 1.15 vs 7.28 ± 1.17 respecto al tratamiento 12 h después del inicio del celo (grupo A) y la presencia de folículos grandes que no son deseables al momento del lavado fue altamente significativa ($P < 0.001$) para el grupo A (4.28 ± 0.36) vs (1.62 ± 0.40) para el grupo B. No hubo correlación significativa entre los niveles de P4 al inicio del tratamiento con ninguno de los parámetros evaluados. Se concluye que el pico preovulatorio de LH mostró gran variabilidad. La aplicación de anti-PMSG monoclonal 24 horas después del celo incrementó la producción de embriones transferibles y la tasa ovulatoria, y disminuyó la cantidad de folículos grandes al momento del lavado, por lo que este tratamiento puede mejorar los resultados de la superovulación en la transferencia de embriones.

ABSTRACT

Superovulatory response and embryo quality in Holstein cows treated with anti-PMSG in late preovulatory LH surge.

BY

SERGIO IGNACIO BARRAZA ARAIZA

MASTER OF SCIENCE

ANIMAL REPRODUCTION

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

Torreón, Coahuila. December 1997.

Dr. Carlos Leyva Orasma - Advisor

Key Words: Cows, anti-PMSG PMSG, superovulation, embryo transfer, embryo quality.

The effect of anti-PMSG injection after the oestrus onset in PMSG superovulated cows (n=22) with a normaly cycling reproductive tract was evaluated in two farms from Region Lagunera, they was synchronized with a prostaglandin F2 α analogue (PG) 2.00 ml (Prosolvin[®] Intervet) and superovulated i.m. with 3000 IU of PMSG (Folligon[®] Intervet) at day 11 of oestrus cycle, followed 48 h later by 15.00 mg PG. Blood samples were obtained by venicoccigeal puncture daily until 24 h after PG injection, then at 6 h intervals until 8 h before the expect oestrus onset, thereafter blood samples were taken at an hourly intervals until 10 h after the oestrus onset. All cows in trial were inseminated at 12 and 24 h after oestrus

onset and divided in two groups, 11 of them (A group) received i.m. a 2.00 ml monoclonal anti-PMSG (CIMA-Cuba) dosage at first insemination and the remaining 11 cows (B group) received the same monoclonal anti-PMSG dosage at second insemination. Levels of LH and P4 were measured by radioimmunoassay. Retrospectively the relationship among anti-PMSG injection time and the preovulatory LH peak was determined. Embryo recovery was made at 7th. day after first insemination and the obtained embryos were evaluated and transferred by non surgical technique in previously synchronized heifers. One day previous to the embryo recovery, both the superovulatory response and ovulation rate were evaluated by transrectal inspection. The preovulatory LH peak averaged 48.38 ± 2.21 h after PG and 2.29 ± 1.20 h after oestrus onset in all treated cows. Anti-PMSG was administered at 11.00 ± 1.85 and 20.55 ± 1.55 h after LH peak to A and B group respectively.

Treatment with anti-PMSG at 24 h after oestrus onset (group B) improved significantly ($P < 0.05$) transferable embryos (1 and 2 grades) and ovulation rate 5.10 ± 0.54 vs 2.57 ± 0.75 and 11.25 ± 1.15 vs 7.28 ± 1.17 as regards 12 h after oestrus onset treatment (group A). Highly significant difference ($P < 0.001$) on large follicles at recovery embryo time 4.28 ± 0.36 and 1.62 ± 0.40 for A and B groups respectively. There was no significant correlation between P4 levels at treatment beginning with any of the evaluated parameters. It is concluded that preovulatory LH peak has a large variability. The monoclonal anti-PMSG administered at 24 hours after oestrus onset improved yield of transferable embryos and ovulation rates, and there was a reduction in large follicles. Therefore, in a practical point of view it may be a positive alternative in the attempts to improve the efficiency in MOET programs.

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-PMSG.- Antiserum Pregnant mare serum gonadotrophin
CIMA.- Centro de Investigación y Mejoramiento Animal.
E2.- Estradiol
eCG.- Equine corionic gonadotrophin
ET.- Embryo Transfer
FSH.- Follicle stimulant hormone
GnRH.- Gonadotrophin release hormone
hCG.- Gonadotrophin corionic human
hMG.- Gonadotrophin menopausic human
i.m.- Intramuscular
LH.- Luteinizing hormone
mg.- Miligramos
ml.- Mililitros
MOET.- Multiple ovulation and embryo transfer
ng.- Nanogramos
P4.- Progesterona
PG.- Prostaglandina
pg.- Picogramos
PgF2 α .- Prostaglandina F2 α
PMSG.- Pregnant mare serum gonadotrophin
s.e.m.- Standard error median
TE.- Transferencia de embriones

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vii
I. Introducción	1
1.1. Objetivo General	5
1.2. Objetivos específicos	5
1.3. Hipótesis	5
II. Revisión de Literatura	6
2.1. Breve reseña de la transferencia de embriones en México	6
2.2. Dinámica folicular en la vaca	8
2.3. La superovulación como paso fundamental en la T.E.	10
2.3.1. Variabilidad en la respuesta superovulatoria	16
2.3.2. Composición química y Superovulación con PMSG.....	16
2.3.2.1. Tratamiento y dosis de la PMSG	18
2.3.2.2. Endocrinología en la superovulación	20
2.4. Papel de la LH en las diferentes etapas del desarrollo folicular y maduración ovocitaria	24
2.5. Algunos reportes sobre vacas tratadas con PMSG+anti-PMSG y su relación con el pico preovulatorio de LH	27
III. Materiales y Métodos	34
3.1. Localización del trabajo experimental.....	34
3.2. Animales experimentales	34
3.3. Manejo y tratamiento de los animales	35
3.4. Detección de celos	36
3.5. Muestreo sanguíneo	36
3.6. Determinación hormonal	37
3.7. Recuperación y clasificación embrionaria	37
3.8. Análisis estadístico	38
IV. Resultados	39
4.1. Pico preovulatorio de LH dinámica de la P4 durante el tratamiento superovulatorio	39
4.2. Respuesta superovulatoria	40

4.3. Calidad embrionaria.....	41
V. Discusión	46
VI. Conclusiones	51
VII. Literatura citada.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Dinámica de la LH sérica en dos vacas superovuladas con PMSG, con respuesta (1) y sin respuesta (2) superovulatoria.....	42
2	Concentraciones séricas medias $\pm$ s.e.m. de P4 en el total de las vacas muestreadas después del tratamiento superovulatorio.....	42
3	Patrones hormonales típicos de P4 y LH séricas en una vaca superovulada con PMSG muestreada al inicio del tratamiento superovulatorio y hasta 10 horas después del inicio del estro	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Respuesta superovulatoria y porcentaje de recuperación en vacas superovuladas con PMSG y anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del estro.....	40
2	Calidad de la respuesta superovulatoria en vacas superovuladas con PMSG y Anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del estro	40
3	Efecto de la inyección de anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del celo en vacas Holstein superovuladas con PMSG sobre la calidad embrionaria	41

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los retos más grandes para el hombre es la producción suficiente de alimentos de calidad para satisfacer las demandas de una creciente población a nivel mundial que día con día exige la eficientización de los recursos disponibles y el máximo aprovechamiento biológico de las especies destinadas a la producción de alimentos.

Las biotecnologías aplicadas a la producción animal ofrecen sin duda una alternativa de solución a los grandes problemas que enfrentan los productores a nivel mundial, particularmente la transferencia de embriones (T.E.) en el ganado es una de las tecnologías reproductivas que ofrece más ventajas en los programas de explotación intensiva (Wiltmut, 1980).

En América Latina y particularmente en México estas tecnologías no han sido lo suficientemente difundidas para utilizarlas como una práctica rutinaria. Las razones, entre otras, pueden estar dadas por problemas económicos, desconocimiento de los beneficios de su aplicación, manejo inadecuado de los programas reproductivos convencionales, alimentación deficiente y a la competencia entre los especialistas que han tenido la oportunidad de adquirir conocimientos y habilidades para su aplicación (Leyva *et al.*, 1997).

La efectividad de esta técnica sólo puede ser mejorada a medida que se eficienten los tratamientos superovulatorios de las donantes, lo cual permitirá aprovechar al máximo el potencial reproductivo de los animales de alto valor genético. Sin embargo, la superovulación sigue siendo una limitante de suma importancia en la implementación de programas de transferencia de embriones en la ganadería.

La hembra bovina posee características en su fisiología reproductiva que hacen que esta especie tenga un intervalo generacional largo, la vaca es un animal uníparo y alcanza su estado o aptitud reproductiva entre los 15 y 24 meses y la duración de la gestación es de nueve meses por lo que a pesar de los esfuerzos que se realizan en su reproducción, las vacas lecheras en los sistemas de explotación intensivos son eliminadas entre los cuatro y cinco años de edad o sea después de tres a cuatro partos, por lo que su vida productiva queda reducida a tres o cuatro años (Campbell, 1993).

La fuente gamética de las hembras bovinas puede ser mejor aprovechada y esto es posible actualmente mediante la transferencia de embriones y para ello es fundamental la superovulación (Holy, 1987).

Los resultados de la superovulación están influenciados por varias causas que van desde factores individuales del animal hasta otros como el clima, raza, alimentación, el tipo y la dosis de la hormona, el período del ciclo estral en que se aplica, el estado reproductivo del animal, la edad, la lactancia y otros (Hahn, 1992). Es por ello que la ovulación no puede verse como un hecho aislado, sino que se basa en toda una serie de acontecimientos

fisiológicos del animal que parten desde el ciclo estral hasta la respuesta obtenida y que en gran medida son los responsables de que ésta sea de buena calidad (Caral *et al.*, 1985).

Las dos gonadotropinas más frecuentemente utilizadas en los tratamientos superovulatorios de las donantes, son la hormona folículo estimulante (FSH) y el suero de yegua preñada (PMSG), esta última tiene las ventajas de ser aproximadamente tres veces más barata que la primera y de causar menos estrés al animal por requerirse sólo una inyección para lograr los propósitos deseados. Sin embargo, tiene la gran desventaja de producir un gran porcentaje de embriones no transferibles (Goulding *et al.*, 1996).

De acuerdo con Armstrong (1993) hay suficientes evidencias para indicar que la calidad embrionaria se afecta en hembras superovuladas con PMSG, por su vida media relativamente larga en la sangre que es de cinco días aproximadamente, lo que ocasiona anomalías endocrinas producidas por la secreción de estrógenos a partir de folículos que persisten y que se desarrollan durante el período post-ovulatorio.

En los últimos años se ha investigado el uso de la anti-PMSG en los tratamientos superovulatorios con PMSG, pero aparentemente los resultados son contradictorios, en ese sentido algunos autores como Dieleman *et al.* (1987, 1989, 1993); Bevers *et al.* (1993) y Vos *et al.* (1994) reportan efectos beneficiosos y otros Saumande y Chuppin (1981), así como, Callesen *et al.* (1992) no encontraron diferencias significativas a favor de la anti-PMSG. Más recientemente se ha planteado con fuerza que el efecto beneficioso de la anti-PMSG está en relación directa con el momento en que se aplique respecto a

la aparición del pico preovulatorio de LH-estro (Dieleman *et al.*, 1993; Bevers *et al.*, 1993; Vos *et al.*, 1994 y Goulding *et al.*, 1996).

De Loos *et al.* (1991a) plantean que la neutralización de la PMSG durante la fase de maduración final ovocitaria y folicular podría ser una alternativa, pues comprobaron que reduce la cantidad de folículos con niveles estrogénicos anormalmente altos.

Desde el punto de vista práctico, para trabajos de campo es difícil determinar en que momento ocurre el pico de LH, si no se acude a una determinación seriada rápida en el laboratorio.

Como puntos de referencia se han ensayado la aplicación de anti-PMSG a tiempo fijo después de la necesaria aplicación de prostaglandina o tomando como referencia el comienzo del celo. Ambos procedimientos tienen la limitante de la variación, tal como plantean Callesen *et al.* (1992) y por otro lado el desconocimiento del momento exacto del inicio del celo, en algunos casos.

En la mayoría de los ensayos parece ser que la anti-PMSG se ha administrado demasiado temprano con relación al pico preovulatorio de LH y sin una caracterización previa del mismo en hembras superovuladas con PMSG.

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación de la anti-PMSG monoclonal en dos momentos después del pico preovulatorio de LH-celo en relación a la respuesta superovulatoria, así como la calidad embrionaria en vacas Holstein superovuladas con PMSG en la Comarca Lagunera.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar el pico preovulatorio de LH en relación al inicio del celo en vacas Holstein superovuladas con PMSG en la región de La Laguna.
- b) Valorar cuál es el momento más apropiado para la aplicación de la anti-PMSG con relación al inicio del celo y al pico preovulatorio de LH.

1.3. Hipótesis

La aplicación de anti-PMSG monoclonal en vacas superovuladas con PMSG en un momento adecuado después del pico preovulatorio de LH-celo mejora la respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Breve Reseña de la Transferencia de Embriones en México

La primera transferencia de embriones con éxito se reportó en 1891, realizada en conejos en la Universidad de Cambridge; desde ese tiempo la transferencia de embriones se ha utilizado como investigación en muchas especies, aunque más extensivamente en ratones, conejos, ovejas y vacas (Ramírez y Miller, 1995).

Rowson, Moor y Lawson, 1972 (citados por Jillella, 1982) perfeccionaron la técnica del trasplante por el método quirúrgico en la vaca y de 1972 a 1979 estos investigadores dirigieron cursos sobre esta materia a científicos de Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y otros países, diseminando de esta manera la implantación de esta técnica en todo el mundo, sin embargo, en México a partir de la década de los 80 se hacen los primeros intentos en la implementación de esta tecnología, pero no es sino hasta a finales de esta década cuando se reportan incursiones más serias en este campo. Jillella (1982) emite un reporte de enseñanza y divulgación por la Universidad de Chapingo dedicado a la transferencia de embriones donde plantea la necesidad urgente de la aplicación de esta biotecnología en la producción animal, sin embargo no señala avances en la aplicación de la misma. Por otro lado, Ramírez y Miller (1995) plantean que en el estado de

Chihuahua hubo una alta demanda por estos servicios desde 1984 a consecuencia del alto precio del ganado de registro, lo cual hacía esta técnica costeable. Estos mismos autores reportan que en ese año llegaron a existir cinco clínicas de transferencia de embriones localizadas todas ellas en ranchos ganaderos privados. En la región ya señalada, a pesar de haber despuntado con un número considerable de laboratorios dedicados a esta biotecnología, no se han reportado hasta la fecha avances significativos en la aplicación práctica y en la solución de problemas en el sector productivo, fundamentalmente en la ganadería bovina.

De acuerdo con López *et al.* (1990) uno de los centros biotecnológicos más avanzados es el del Departamento de Transferencia de Embriones de la Dirección General de Normatividad Pecuaria dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) hoy SAGAR, en Ajuchitán, Querétaro, México el cual en ese año tenía tres proyectos: transferencia de embriones en bovinos, formación de un banco de embriones de mamíferos domésticos y producción de gemelos monocigóticos bovinos mediante la bipartición de embriones. Estos mismos autores señalan que en su mayoría los trabajos en proceso, tanto del sector privado como el público, tienen un carácter preparatorio tanto en recursos humanos como en equipo y materiales, y su valor actual radica en que están abriendo camino para el mejoramiento por medio de la ingeniería genética.

2.2. Dinámica Folicular en la Vaca

El entendimiento del proceso foliculogénico es importante para el éxito en los programas de transferencia de embriones, Murphy y Pescador (1997).

La hembra bovina al nacer tiene alrededor de 150,000 ovocitos primarios y luego disminuye este número, así a los tres meses de vida cuenta con 75,000 ovocitos primarios y a los dos a tres años solamente 21,000 y de los 12 a los 14 años finalizan con 2,500 células germinativas femeninas (Jillella, 1982; Noriega *et al.*, 1995)

Por cada ovocito que madura y es ovulado, muchos más inician su desarrollo, pero sufren un proceso de degeneración antes de llegar a la maduración final. Este proceso de degeneración que sufren la mayoría de los folículos ováricos se conoce como atresia (Rosado y Rosales, 1991).

Dieleman *et al.* (1993); Murphy y Pescador (1997) sugieren que el desarrollo folicular se puede dividir en tres fases: 1) *Reclutamiento* antes del inicio de la luteólisis, 2) *Selección y crecimiento* hasta el pico preovulatorio de LH y 3) *Maduración final* del folículo y del ovocito después del pico de LH hasta la ovulación.

El desarrollo folicular en la hembra bovina se caracteriza por la aparición de olas de crecimiento sincronizado de pequeños folículos, seguida de la selección de un folículo dominante, así como la inhibición y subsecuente regresión de los folículos subordinados (Huhtinen *et al.*, 1992). La mayoría de los ciclos consisten en dos o tres olas foliculares (Pierson y

Ghinter, 1988; Fortune *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1990) y Hopper *et al.*, 1993 (citado por Gordon, 1994) en animales prepúberes. En promedio la emergencia de la ola fue detectada en el día cero del ciclo (día de la ovulación) y en el día 10 en los ciclos de dos olas y en los días cero, nueve y dieciseis en los ciclos de tres olas (Adams, 1994) aunque otros autores como Gordon (1994) opinan que hay una marcada variación individual en la dinámica folicular entre animales, con tan pocas olas foliculares como una, o tantas como cuatro en un ciclo estral. Sin embargo, en estudios previos Rajamahendran y Calder (1993) habían reportado que la emergencia del folículo dominante de la primera ola fue detectable en el día tres del ciclo (día cero = día del celo) en animales de dos o tres olas foliculares y que los animales de dos olas se consideran como normales.

En un ciclo normal los grandes folículos no atrésicos en el ovario de la vaca durante el período entre el pico de la hormona luteinizante (LH) y la ovulación (maduración final) son los folículos preovulatorios, en estos folículos el ovocito reanuda la meiosis desde el segundo arrestamiento hasta la metafase II, poco antes de la ovulación (de Loos *et al.*, 1991b).

En la hembra bovina y otras especies, la foliculogénesis puede dividirse en dos partes de acuerdo a los requerimientos gonadotrópicos de los folículos: foliculogénesis basal, la cual puede proceder al menos parcialmente en ausencia de gonadotropinas y la foliculogénesis tónica la cual requiere de la acción de las gonadotropinas (Driancourt y Fry, 1988).

Las gonadotropinas tienen gran importancia en los procesos de reclutamiento, selección y dominancia. En la ausencia de gonadotropinas, en

animales hipofisectomizados, no hubo reclutamiento de folículos (Dufour *et al.*, 1979; Mc Neilly *et al.*, 1989 y Driancourt *et al.*, 1987). Además, la administración de gonadotropinas exógenas indujeron el reclutamiento, la selección y la dominancia en animales desprovistos de hipófisis. Esto provee una amplia evidencia que sugiere que los fluidos foliculares contienen componentes para la modulación de la acción de las gonadotropinas. Esos componentes pueden actuar en el folículo que los ha estado produciendo (reguladores autocrinos), o en otros folículos (reguladores paracrinos), Murphy y Pescador (1997).

2.3. La Superovulación Como Paso Fundamental en los Programas de Transferencia de Embriones (T.E)

Los resultados de la superovulación están influenciados por varios factores, que van desde la idiosincrasia del animal, hasta otros, tales como el clima, la raza, la alimentación, tipo y dosis de la hormona, momento del ciclo en que se inicia el tratamiento, edad de las donantes y factores de manejo, entre otros (Lermen *et al.*, 1986; Warfield *et al.*, 1986; Alfuraiji *et al.*, 1990; Madan, 1990 y Hahn, 1992).

En general los intentos por mejorar las respuestas ováricas a la superovulación en el bovino se han basado entre otros aspectos, en variar el tratamiento hormonal, en la comparación de preparados hormonales y en los modos de aplicación (Chuppin y Procureur, 1982; Mc. Gowan *et al.*, 1985; Beckers, 1987 y Guilbault *et al.*, 1987).

Los esquemas MOET (*Multiple Ovulations and Embryo Transfer*) en cuanto a resultados, dependen fundamentalmente de la superovulación, cuyo factor más importante es el tratamiento con gonadotropinas (Dieleman *et al.*, 1993). Los preparados para la superovulación más frecuentemente utilizados son la FSH (Boland *et al.*, 1991) y la PMSG (Bouters *et al.*, 1983) y ocasionalmente la hMG (Gonadotropina menopáusica humana), Lauria *et al.* (1982). Las comparaciones directas entre estos preparados, reportadas en la literatura son escasas y con un número limitado de animales, lo cual puede deberse a las regulaciones que existe en algunos países en cuanto al uso de las gonadotropinas.

En la actualidad, no existe un consenso respecto a los efectos beneficiosos de la anti-PMSG en los tratamientos superovulatorios con PMSG. Algunos como Dieleman *et al.* (1989) reportan casi el doble de producción de embriones transferibles, otros, como Boland *et al.* (1991) refieren resultados inferiores al compararlos con los obtenidos con la FSH.

A pesar de estas controversias, la superovulación con PMSG es relativamente más barata y más sencilla de administrar, no causando tanto estrés en el animal, si la comparamos con el régimen superovulatorio con FSH, el cual requiere de varias aplicaciones.

Se piensa que la larga vida media de la PMSG en la sangre provoca una concentración residual después de la estimulación superovulatoria primaria, por lo que se cree que tiene efectos adversos sobre el número de embriones transferibles (Schams *et al.*, 1978; Bevers y Dieleman, 1987).

Para vencer este efecto desfavorable se introdujo la administración de anticuerpos contra la PMSG. Primero se usaba suero policlonal obtenido de ovejas y cabras, más recientemente se están utilizando con mayor frecuencia los anticuerpos monoclonales para el bovino (Dieleman *et al.*, 1989; Callesen *et al.*, 1992; Dieleman *et al.*, 1993 y Vos *et al.*, 1994).

En las últimas décadas estos procedimientos han sido estudiados por diferentes grupos de investigadores, pero los resultados no son uniformes. Más recientemente algunos autores (Dieleman y Bevers, 1987 y Vos *et al.*, 1994) han planteado que el efecto beneficioso de la anti-PMSG en los tratamientos superovulatorios con PMSG está en relación directa con el momento en que ésta se administra después del pico preovulatorio de LH. González *et al.* (1994a) plantean además que la administración del anticuerpo monoclonal entre las 12 y las 18 horas después del establecimiento del estro parece ser el momento óptimo para la aplicación de anti-PMSG.

Según Armstrong (1993) hay suficiente evidencia para pensar que en los tratamientos superovulatorios, especialmente aquellos con PMSG, hay una recuperación escasa de embriones viables en muchas ocasiones, no sólo por fallos en la fertilización, sino por otros factores post-fertilización que conducen a la pérdida embrionaria antes de realizar el lavado uterino. Algunas pérdidas pueden atribuirse a anomalías endocrinas asociadas a la superovulación, lo cual resulta en un medio tubárico y uterino anormalmente inconsistente, con un desarrollo embrionario anormal y un tono uterino sub-normal que hace difícil el lavado.

Las anomalías endocrinas seguidas de la superovulación con PMSG han sido atribuidas tanto a su larga vida media en sangre como a su actividad LH, lo cual estimula la secreción de estrógenos por folículos persistentes durante el período postovulatorio (Armstrong y Leung, 1991). Según otros autores los problemas asociados a la larga vida media en sangre de la PMSG pueden ser parcialmente vencidos por la administración planificada de anticuerpos específicos contra la PMSG que neutralizaría la hormona residual durante el período postovulatorio (Dieleman *et al.*, 1993).

Los efectos de la superovulación con PMSG, sobre la secreción de gonadotropinas, no están claramente definidos en el bovino. Se ha planteado que aunque la secreción de LH durante la fase luteal no se afecta por el tratamiento con PMSG, el pico preovulatorio de LH y la secreción de FSH se ven suprimidos significativamente, presumiblemente debido al efecto inhibitorio de los folículos anovulatorios (Boland *et al.*, 1991).

En un trabajo realizado por Kummer *et al.* (1982) no encontraron evidencia de algún efecto del antisero contra la PMSG sobre los niveles de 17 β estradiol (E2) y progesterona (P4).

Sin embargo González *et al.* (1994b) encontraron correlación entre las concentraciones plasmáticas de P4 con las tasas ovulatorias en todos los grupos experimentales. Los niveles de P4 en el momento del estro fueron más bajos en las hembras con cinco o más embriones transferibles que en aquellas con embriones no transferibles.

La actividad LH de la PMSG, presumiblemente causa estimulación del cuerpo lúteo preexistente y la luteinización de los folículos, causando altos niveles de P4 durante el estro, disminuyendo la liberación de LH endógena, provocando bajos niveles de fertilización y pobre calidad embrionaria (Foote y Ellington, 1988).

De acuerdo con de Loos *et al.* (1991a), la neutralización de la PMSG durante la maduración final, por ejemplo: al administrar anti-PMSG inmediatamente después del pico de LH, reduce un 9.7 por ciento los folículos con niveles de estradiol anormalmente altos. En tal caso, a las 24 h después del pico preovulatorio de LH, el 20 por ciento de los ovocitos están en fase de vesícula germinal y ocasionalmente en fase de folículo completamente luteinizado con *cumulus* expandido.

En un experimento conducido por Dieleman *et al.* (1987), después de la neutralización de la PMSG en el momento del ascenso del pico preovulatorio de LH, de 29 folículos de tamaño pre-ovulatorio presentes sólo hubo ovulación en 6.3, comparados con el grupo que recibieron anti-PMSG inmediatamente después del pico de LH de los cuales se produjeron 20.3 ovulaciones. Estos mismos autores sostienen que la neutralización de la PMSG, incluso a etapas más tempranas, causa regresión funcional pero no morfológica de la población folicular, causando una supresión del pico preovulatorio de LH en la mayoría de las vacas.

Se han hecho algunos trabajos con la determinación rápida del pico de LH y aplicando la anti-PMSG a 6 y 18 horas del pico con un grupo control (solución salina) y se ha observado que los mejores resultados se han

obtenido cuando se aplica a las 18 horas (Bever *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994a, 1994b).

Otro aspecto importante y determinante en los programas MOET son las tasas de gestación de las receptoras, después de transferir embriones morfológicamente aptos para obtener una gestación. Las gonadotropinas inyectadas para obtener la superovulación en una vaca, actúan en diferentes estados de desarrollo del folículo y ovocito, incluyendo la maduración final del ovocito y la esteroidogénesis folicular, el transporte del espermatozoides y la fertilización y por último en el desarrollo de los embriones en el oviducto y en el útero hasta que son recuperados al día siete del ciclo. Algunos de estos cambios son reflejados en las concentraciones periféricas de P4 y LH fundamentalmente (Domeki, 1991). Este mismo autor, sostiene que el resultado final es un profundo efecto sobre el ovocito, el embrión precoz y su micromedio, de manera que un embrión que morfológicamente parece viable y de buena calidad al día 7 después del lavado, puede haber sufrido daños no detectables tanto en etapa de ovocito o de las primeras etapas de desarrollo embrionaria, que sólo pueden ser determinados después de ser transferidos, cuando no son capaces de desarrollar una gestación.

Según Markette *et al.* (1985) mientras que hasta un 70 por ciento de las receptoras de embriones en el bovino llegan a parir un ternero vivo bajo condiciones ideales, el promedio más probable es cercano al 60 por ciento bajo condiciones rutinarias, cuando los procedimientos son llevados a cabo adecuadamente por personas bien adiestradas en la T.E, los porcentajes como tal pueden incluso estar por debajo del 50 por ciento.

De acuerdo con Armstrong (1993) el régimen hormonal y la magnitud de la respuesta superovulatoria de la donante pueden afectar la viabilidad de los embriones en la receptora después de la transferencia.

Greve *et al.* (1995), afirman que la sobreestimulación, tanto con FSH como con PMSG, causan alteraciones de la fisiología reproductiva normal de la donante, sin embargo, plantean que los embriones transferibles tienen igual oportunidad de sobrevivir independientemente de su calidad, a partir del día 42 hasta el parto, de acuerdo a las tasas de gestación después de la transferencia y a las tasas de mortalidad fetal.

Slenning y Wheeler (1989) encontraron un pequeño incremento en el número de gestaciones en donantes superovuladas con PMSG que en aquellas tratadas con FSH, pero la viabilidad fue mayor para esta última.

2.3.1. Variabilidad en la Respuesta Superovulatoria

La falta de la predicción confiable en cuanto a una producción eficiente de embriones es el factor limitante más grande que existe en la aceptación del uso de la transferencia de embriones (Gordon, 1982). Por esta razón es prioritario conocer las causas que afectan la producción de embriones transferibles con los esquemas superovulatorios disponibles (Seidel y Seidel 1981; Boland *et al.*, 1991).

De acuerdo con Goulding *et al.* (1996) las grandes variaciones individuales en la respuesta superovulatoria se presentan en regímenes

hormonales tanto de PMSG, como de FSH. Incluso hay autores como González *et al.* (1994b) que opinan que aún con la utilización de PMSG/anti-PMSG se sigue evidenciando la variabilidad en la respuesta. Otros autores mencionan factores de igual importancia tales como: el momento del ciclo estral en que se inicia el tratamiento, Goulding *et al.* (1990); la estación del año, Moneva y Petrov (1989); la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, Guilbault *et al.* (1991) así como Bungartz y Niemann (1994). Todos estos factores afectan la respuesta superovulatoria, aunque no coinciden con las afirmaciones de Wilson *et al.* (1990) quienes encontraron que no hay una influencia significativa por la presencia de un folículo dominante.

2.3.2. Composición Química y Superovulación con PMSG

De acuerdo con Varisanga (1993), la PMSG fue descrita en 1930 por Cole y Hart y es producida por los cálices endometriales, aparece en la sangre de la yegua muy tempranamente después de la concepción y a los 40 días puede comprobarse biológicamente, alcanzando sus mayores niveles entre los 60-70 días, a partir de los cuales inicia su disminución hasta niveles no detectables entre los 170 y 180 días de la preñez (Holy, 1987).

Esta gonadotropina extrahipofisiaria tiene una composición química glicoprotéica, en la cual se aprecia un 45 por ciento de contenido de carbohidratos, cantidad muy superior a la encontrada en la FSH y en la LH. Igualmente, la proporción de ácido ciálico (10.8 por ciento) es superior a la de las gonadotropinas hipofisiarias FSH y LH. Es importante señalar que el ácido

ciático parece estar relacionado con la vida media sanguínea de esta hormona (Papkoff, 1978 y Boland *et al.*, 1991).

Por otra parte el peso molecular de la PMSG determinado por Gospadorowicz (1972) evidencia el gran tamaño de su molécula (53,000 Daltons) lo que dificulta su excreción, alargando su permanencia en sangre.

Papkoff (1974) encontró que la molécula de PMSG se desdobla en dos sub-unidades (alfa y beta) las cuales por separado pierden su actividad, por lo que se demostró que los efectos biológicos de la misma son inherentes a la molécula íntegra y no a sus fracciones, en el mismo sentido Boland *et al.* (1991) plantean que esta composición molecular consiste en una sub-unidad α estructuralmente similar y una sub-unidad β biológicamente específica.

La PMSG tiene acciones biológicas similares a las de LH y FSH. Las semejantes a la LH incluyen: el estímulo de las células intersticiales del ovario, la inducción de la ovulación y la luteinización de las células de la granulosa, mientras que como FSH la PMSG es un potente estimulador del crecimiento ovárico y aumenta los niveles de E2 en la sangre, producto de la reacción folicular (Cole y Cupps, 1984).

2.3.2.1. Tratamiento y Dosis de la PMSG.

La PMSG ha sido el estimulante ovárico por excelencia empleado en la superovulación y comparado con la FSH es de bajo costo, fácil de administrar y efectivo (Slennig y Wheeler, 1989).

Los primeros tratamientos superovulatorios utilizaban la PMSG en la fase final del ciclo estral, acompañada o no de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Gordon, 1975). Estos procedimientos reportaban resultados muy variables en cuanto a la presentación del estro después del tratamiento, porcentaje de respuesta y calidad de los embriones obtenidos.

En la actualidad el tratamiento descrito por Rowson (1975) (citado por Campbell 1993) empleando la combinación de las acciones de la PMSG y la prostaglandina F_{2α} y aplicado en la fase media luteal no ha perdido vigencia. Petr *et al.* (1990) encontraron en vacas superovuladas con PMSG incrementos considerables en el número de ovulaciones y embriones fertilizados. Otros investigadores como Gordon (1975) y Saumande y Chuppin (1987) evaluaron la aplicación de la PMSG en dosis fraccionadas con resultados muy variables, por lo que llegaron a la conclusión de que la mejor respuesta fue cuando se aplicó la PMSG en una sola dosis disuelta en un pequeño volumen. Sin embargo la respuesta ovárica y la obtención de embriones transferibles después de la superovulación es muy variable y el efecto negativo sobre la calidad de los embriones pudo haber sido antes o después de la ovulación (Miller y Armstrong, 1982).

En relación con el día del inicio del tratamiento en la fase media luteal (8-14 días) diferentes autores sostienen que no hay grandes diferencias en los resultados aunque todos coinciden en que las mejores respuestas son obtenidas al iniciar el tratamiento entre los días 10 y 12 del ciclo estral (Hasler *et al.*, 1983; Ali Dinar *et al.*, 1987 y Herrler *et al.*, 1990).

La PMSG se utiliza para tratamientos superovulatorios en dosis de 1500 a 2000 UI en vaquillas y de 2000 a 3000 UI en vacas. En ese sentido Greve *et al.* (1988) sugieren que dosis superiores a 3000 UI incrementan el número de ovulaciones pero afectan significativamente la calidad embrionaria.

Otros autores como Saumande y Chuppin (1977) señalan que la aplicación de tratamientos superovulatorios repetidos provoca la disminución temporal de folículos capaces de responder a la PMSG, pero también refutan la posibilidad de que la baja respuesta se deba a la producción inmunológica de anticuerpos debido a que hubo un ligero aumento en el número de ovulaciones al final de las aplicaciones repetidas de PMSG, y que aún después de la aplicación de FSH la respuesta continuó siendo baja a pesar de que la anti-PMSG no inhibe la acción de la FSH.

Según Almeida (1987) después de cinco o más tratamientos consecutivos con PMSG se incrementa significativamente ($P < 0.05$) el número de vacas que no eran lavadas por no presentar una buena respuesta superovulatoria a la palpación rectal, con lo cual se demuestra una tendencia a la disminución de las ovulaciones y obtención de embriones por vaca lavada.

Petr *et al.* (1990) sugieren que una pequeña dosis (200 UI) de PMSG al inicio del tratamiento superovulatorio (día cuatro del ciclo estral) seguida de la aplicación de 2800 UI entre los días 9 y 14 del ciclo tiene un efecto positivo sobre la tasa ovulatoria y porcentaje de ovocitos fertilizados en el grupo tratado vs control (2800 UI PMSG), pero no hay diferencias significativas en

el porcentaje de producción de embriones y en la calidad embrionaria entre los dos grupos.

Los resultados obtenidos con la utilización de PMSG en vacas lecheras son variables. Herrler *et al.* (1990) al emplear 2,500 UI de PMSG obtuvieron una media de cuerpos lúteos de 12.20 ± 2.40 y 3.80 ± 1.10 de embriones transferibles. Huhtinen *et al.* (1992) tuvieron mejores resultados obteniendo una media de 7.10 ± 1.10 embriones transferibles al aplicar 2,500 UI de PMSG entre los días nueve y doce del ciclo estral.

De acuerdo con Zeitoun *et al.* (1991) la dosis de PMSG no debe exceder de 3000 UI ya que en un trabajo que realizó en ganado de carne pudo constatar que con dosis superiores a las recomendadas se afectó significativamente la obtención de embriones tanto en cantidad como en calidad.

2.3.2.2. Endocrinología en la Superovulación

Los eventos endocrinológicos envueltos en el ciclo estral de vacas no superovuladas difiere de aquellas superestimuladas en cuanto a las concentraciones hormonales en diferentes momentos del ciclo (Dieleman *et al.*, 1988a y Roberge *et al.*, 1995), estos autores señalan que las diferencias radican principalmente en las concentraciones de progesterona y estradiol cuantificadas después de la aplicación de la PG, siendo mayor en las vacas superovuladas que en las no estimuladas. También aseguran que la

frecuencia y los pulsos, así como los niveles basales de LH fueron menores en las vacas superovuladas

En las hembras bovinas superovuladas ocurren diversos eventos que han conducido a la creación de varias técnicas de detección de los mismos, entre las que se encuentran: la observación de los ovarios después de sacrificar los animales, a través de endoscopías y con el uso de la ecosonografía (Thayer *et al.*, 1985) y el estudio de las variaciones hormonales en relación con los cambios ováricos y la producción de embriones (Saumande, 1980; Greve *et al.*, 1983; Callesen *et al.*, 1990).

El inicio en el crecimiento (> 5 mm.) y la proliferación folicular ocurren al menos 48 horas después de haber comenzado el tratamiento gonadotrópico, esto indica que al momento del suministro de la gonadotropina los folículos destinados a ovular o luteinizarse tienen un tamaño inferior o igual a tres o cuatro milímetros (Dieleman *et al.*, 1988c).

En animales no tratados al momento del celo, unas horas antes de la ovulación, el diámetro preovulatorio medio es de 9 a 10 milímetros que es inferior al encontrado en animales superovulados (14 mm). Este suceso hace suponer que las gonadotropinas exógenas aceleran los procesos de maduración folicular, en particular el desarrollo de receptores para la LH en las células de la granulosa (Murphy y Pescador, 1997).

De acuerdo con Wilson *et al.* (1990), la presencia de "grandes folículos" al momento de la aplicación de la gonadotropina no tiene influencia sobre la respuesta ovárica ulterior. Lo cual es debido, posiblemente, a que

estos folículos ya eran atrésicos (Pierson y Ghinter, 1984) contrariamente a lo que ha sugerido Saumande *et al.* (1987).

Callesen *et al.* (1990), en una caracterización de los perfiles hormonales después de la superovulación concluyen que las determinaciones de E2 plasmático, en diferentes momentos en relación a la aplicación de la prostaglandina, pueden ser utilizadas en la evaluación de la respuesta superovulatoria de las vacas donadoras en términos de tasas ovulatorias y calidad de los ovocitos. De acuerdo con González *et al.* (1994) hay una correlación significativa ($P < 0.02$) entre los niveles plasmáticos de estradiol preovulatorio y el número de ovulaciones y folículos anovulatorios en animales superovulados ($r = 0.96$).

En el trabajo realizado por Domeki (1991), se observó que en animales superovulados, el pico preovulatorio de LH ocurrió dentro de las primeras 10 horas y la ovulación tuvo lugar 25 horas después del inicio del estro, también llegó a la conclusión de que los niveles de LH fueron más bajos en animales superovulados que en animales no tratados.

Las ovulaciones son sincrónicas en los animales superovulados aunque se producen en un período variable, según el animal en particular. Yadav *et al.* (1985), observaron las primeras ovulaciones después de las 65 horas de suministrada la PG. Otros autores como De Armas *et al.* (1985), aducen que las ovulaciones ocurren en un intervalo de 48 h, por lo que los embriones obtenidos se encuentran en diferentes etapas de desarrollo.

A partir de la ovulación comienza el desarrollo de los cuerpos lúteos lo que puede ser apreciado después del tercer día por palpación rectal, alcanzando su mayor tamaño entre los nueve y catorce días (Peters y Ball, 1995)

Un estudio sobre las variaciones hormonales relacionado con la superovulación realizado por Saumande *et al.* (1980) arrojó los siguientes resultados:

- 1) Cuando la gonadotropina es inyectada en presencia de un cuerpo lúteo activo en la fase media luteal se observa un ligero incremento en los niveles de progesterona, lo cual parece estar ligado a la fracción de LH que se encuentra en la PMSG empleada en la superovulación.
- 2) En seguida, ocurre la luteólisis inducida por PG con las mismas características que en el ciclo normal, disminuyendo los niveles de progesterona por debajo de 1 ng/ml.
- 3) El incremento de progesterona después de la ovulación está correlacionada con el número de cuerpos lúteos ($r = 0.90$) y aparece más tempranamente en los animales tratados que en los animales no tratados (segundo día del ciclo), llegando a alcanzar niveles mucho mayores.
- 4) El efecto del suministro de gonadotropinas sobre los niveles de E2 es un indicador importante respecto al crecimiento folicular. Así, 24 horas después de la inyección de gonadotropinas en los animales estimulados, se manifiesta un aumento en las concentraciones de E2. Las máximas

concentraciones son detectadas poco antes del pico preovulatorio de LH y pueden superar hasta en 10 veces las registradas en animales no tratados (160 pg/ml contra 15 pg/ml, respectivamente). Estos niveles se han correlacionado consistentemente con el número de folículos maduros listos para la ovulación ($r = 0.90$).

- 5) Después de la descarga preovulatoria de LH en la ovulación las concentraciones de estradiol disminuyen rápidamente a sus niveles basales. Esta descarga preovulatoria alcanza magnitudes superiores a la registrada en animales no superovulados, pero no es sostenida, regresando rápidamente a sus niveles basales.

Greve *et al.* (1984), encontraron que los tratamientos superovulatorios frecuentemente interfieren la descarga preovulatoria de LH, arrojando patrones anormales. En el caso de la estimulación con PMSG, se produjo antes (40.90 ± 8.40 h) que en el caso de emplear FSH (44.90 ± 12.10 horas) en referencia a la inyección de PG, en este orden de ideas Bevers y Dieleman (1987), sostienen que el intervalo es muy variable siendo de 33-49 h. El intervalo del estro al pico de LH fue muy variable y los signos del estro no fueron un estimador aceptable para la determinar la ocurrencia de la descarga de LH. Sin embargo, Gielen *et al.* (1990) y Domeki (1991) concluyen que la aplicación de anti-PMSG en un momento del celo en que se dejan montar (standing-heat) tiene un efecto positivo sobre la calidad de los embriones obtenidos.

2.4. Papel de la LH en las Diferentes Etapas del Desarrollo Folicular y Maduración Ovocitaria

La hormona luteinizante es una glicoproteína con un peso variable en dependencia de la especie animal con valores de 25,000-30,000, 28,000-32,000 y de 27000-34000 Daltons para la vaca, oveja y cerda respectivamente (Cole y Cupps, 1984). Químicamente la LH se diferencia de la FSH en que la actividad biológica de la LH está representada por la fracción proteínica, pues la destrucción de la fracción glucósida no influye en su actividad biológica (Convey *et al.*, 1971; Hibson y Hansel, 1972 y Schallenberger *et al.*, 1978). No obstante, la LH no se diferencia sólo por su peso molecular entre varios tipos de animales domésticos, sino también inmunológicamente ya que se ha encontrado que la LH de origen vacuno es contraria inmunobiológicamente de la LH de origen porcino, siendo la fuente más rica de esta hormona la hipófisis de la oveja, del cerdo y del ganado vacuno. En cuanto a la secuencia de los aminoácidos se ha comprobado que existen dos tipos de LH, la alfa con 90 aminoácidos y la beta con 120 aminoácidos, correlacionándose la actividad biológica e inmunológica con el tipo beta (Ellendorf *et al.*, 1974).

Desde el punto de vista funcional, la LH se encadena a la actividad de la FSH y en su colaboración se realiza la maduración final del folículo *De Graaf*, con elevada liberación de LH preovulatoria, a lo que se atribuye la ruptura de la pared folicular y a la ovulación sin un cuerpo lúteo (Peters y Ball, 1995). Se ha planteado que los estrógenos pueden iniciar la liberación preovulatoria de LH y FSH mediante la potencialización de la liberación de GnRH (Hinshelwood *et al.*, 1986). Existen dos centros en el hipotálamo que

regulan la liberación de LH y FSH. La liberación preovulatoria mediante los estrógenos es estimulada por medio de un mecanismo de retroacción positiva en el área hipotalámica anterior del núcleo preóptico y disminuyen la liberación tónica de la LH y la FSH por un mecanismo de retroacción negativa en el núcleo arcuato, en el núcleo ventromedial y en la eminencia media del hipotálamo (Jackson *et al.*, 1979).

Revah y Butler (1996), mencionan que Wert y Larsen en 1990, sugirieron una hipótesis para explicar la maduración folicular por la LH, en la que señalan que esta gonadotropina induce la degradación de la unión de los espacios que aparejan las células de la pared de la granulosa con las células del *cumulus*, resultando en una disminución del aporte de las sustancias mediadoras del arrestamiento meiótico de estas células al ovocito. En el mismo sentido, Revah y Butler (1996) aducen que el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH, resultado de los bajos niveles de progesterona afectan lentamente las uniones de los espacios entre la pared de las células de la granulosa. La degradación de la unión de los espacios puede permitir al ovocito resumir la meiosis mientras aún está dentro del folículo.

En el trabajo publicado por Rosado y Rosales (1991) en el que describen los procesos bioquímicos de la maduración folicular, sugieren que la somatomedina-C puede ser producida por las células de la granulosa para la regulación autocrina de la reproducción de sus propias células, así como la inducción de los receptores de la LH. Los mismos autores reportan que Dekel *et al.*, en 1988 encontraron que la actividad inductora de la maduración folicular ejercida por la LH dependía de la capacidad de esta hormona para

fijarse a los receptores de las células de la granulosa, y que era un factor importante de la maduración folicular, y que en ausencia de cantidades adecuadas de receptores para la LH en las células de la granulosa, provocaban que el ovocito no madurara adecuadamente.

Peters y Ball (1995) sostienen que en los bovinos la división ovocitaria comienza en la vida fetal temprana, pero cesa en un punto intermedio (etapa diploteno) de la primera división meiótica. La reanudación meiótica es estimulada por el pico preovulatorio de LH y está caracterizada por el rompimiento de la vesícula germinal, por la condensación cromosómica funcional del primer alargamiento meiótico, por la expulsión del primer cuerpo polar y por el arrestamiento en la metafase de la segunda división meiótica. Los mismos autores hacen mención que la expulsión del primer cuerpo polar ocurre sobre las primeras ocho a nueve horas después del pico preovulatorio de LH, así como, que las dos primeras divisiones ocurren rápidamente, una justo antes de la ovulación y la segunda después de la fertilización. La primera es una división meiótica en la cual el complemento cromosomal del ovocito se reduce a la mitad (30). En lugar de las cuatro células producidas por esas divisiones, sólo una es formada, y un cuerpo polar en cada división. Estos cuerpos polares son la otra mitad de la división celular pero están desprovistos de la mayoría de su citoplasma y se degeneran invariablemente.

2.5. Algunos Reportes Sobre Vacas Superovuladas con PMSG/anti-PMSG y su Relación con el Pico Preovulatorio de LH

Campbell (1993) reporta que Jainudeen *et al.* en 1966 encontraron por primera vez que en el suero sanguíneo de animales tratados con PMSG repetidamente, aparecía una sustancia que inhibía la actividad biológica de la PMSG al combinarse con los residuos circulantes de esta gonadotropina que quedaban libres después de haber cumplido su misión superovulatoria.

Debido a su larga permanencia en la sangre, la PMSG trae consigo resultados indeseables, tales como el crecimiento de nuevos folículos con el consiguiente incremento en los niveles de E2 que provoca un *status* inadecuado para los embriones y éste, parece ser el efecto negativo más importante sobre la calidad embrionaria en la superovulación con PMSG (Saumande *et al.*, 1984; Bevers y Dieleman, 1987; Dieleman *et al.*, 1988a; Gielen *et al.*, 1990 y Goulding *et al.*, 1996).

Para la producción de un antisuero se han empleado diferentes especies de animales (conejos, cabras, ovejas, etc.) pero para evitar las reacciones anafilácticas y producción de sueros contra proteínas, Saumande y Chuppin (1981) realizaron un estudio en bovinos mediante la inducción de anti-PMSG para lo cual utilizaron una vaca y un toro a los que les suministraron 5000 UI de PMSG intramuscular en coadyuvante de Freud. La inyección del antisuero obtenido en este experimento 12 horas después del inicio del celo en animales superovulados, produjo un incremento en el número de embriones transferibles (3.7 vs 1.9) y la cantidad de folículos

grandes disminuyó en animales tratados con el antisuero (2.4 vs 3.5) comparados con el grupo control.

Pérez *et al.* (1987), obtuvieron resultados satisfactorios en la producción de antisuero contra la PMSG al inmunizar una vaca durante seis meses con un programa de inyecciones, en serie de cuatro aplicaciones, a intervalos de siete días y repetidas a los 21 días. Después de la segunda serie se aplicó un acelerador mensual por tres veces (5000 UI en cada inyección).

Moyaert *et al.* (1985), prepararon y compararon la efectividad de un antisuero monoclonal contra la PMSG con otro antisuero PMSG de origen caprino en vacas superovuladas con 3000 UI el día 10 del ciclo y 37.5 mg de $PgF_{2\alpha}$ el día 12. Ambos anticuerpos fueron suministrados durante el primer día del estro. Estos investigadores encontraron que en los grupos de animales tratados con el anticuerpo monoclonal presentaron menos folículos anovulatorios que aquellos tratados con el antisuero de cabra el día del lavado (medias = 1.7 y 2.7) y mejores niveles de fertilización (92 y 80 por ciento) respectivamente, contra 6.5 folículos y 60 por ciento de fertilización en el grupo control. En cuanto al perfil hormonal, se registró que los estrógenos llegaron a niveles basales después de las 24 horas del tratamiento con anti-PMSG y que se mantuvieron así hasta el momento del lavado, en contraste con los no tratados, en los que se registró un segundo pico estrogénico después del celo, decreciendo posteriormente también a niveles basales, estos reportes coinciden con los publicados por González *et al.* (1994a) y Goulding *et al.* (1996) en los que hacen referencia al incremento

significativo en la respuesta superovulatoria y en la calidad embrionaria en animales tratados con anti-PMSG en comparación con los no tratados.

Saumande y Chuppin (1987) estudiaron diferentes pruebas para determinar la efectividad del antisuero contra la PMSG producida a partir de ovinos, caprinos y bovinos, comparada con un anticuerpo monoclonal, concluyendo que la inhibición de la superovulación en bovinos es el método más adecuado para probar la anti-PMSG destinada a la superovulación de esta especie.

En otro experimento, Wang *et al.* (1987), realizaron estudios para establecer el intervalo después de la aplicación de $\text{PgF}_{2\alpha}$ en que debía administrarse la anti-PMSG (40 y 60 h) y un grupo no tratado con antisuero. Ambos grupos tratados tuvieron mayor cantidad de ovulaciones, de embriones totales y de embriones transferibles que el grupo de animales no tratados.

Dieleman y Bevers (1987) y Dieleman *et al.* (1989), trataron de relacionar el momento óptimo de la aplicación de la anti-PMSG con el pico preovulatorio de LH y observaron que éste tuvo una media de 4.8 ± 0.2 horas después del celo y el número de ovulaciones por vaca mostró un incremento significativo ($P < 0.05$) para las vacas tratadas con anti-PMSG. Más recientemente Bevers *et al.* (1993) y Kuran *et al.* (1996) reportan que hay un incremento en la obtención de embriones transferibles y una reducción significativa de grandes folículos y quistes foliculares cuando la anti-PMSG fue aplicada a las 18 horas después del pico preovulatorio de LH, aunque no encontraron un efecto importante sobre las tasas ovulatorias. Estos

resultados evidencian que la neutralización de la PMSG poco después del pico preovulatorio de LH influye positivamente en la maduración final de los folículos preovulatorios de la vaca y son coincidentes con los resultados obtenidos posteriormente por Vos *et al.* (1994). Como esto se refleja en la esteroidogénesis folicular, en la maduración de los ovocitos y en la calidad embrionaria, ofrece grandes perspectivas en el desarrollo de nuevas investigaciones.

En un trabajo realizado por Greve *et al.* (1995) en relación a los efectos de las diferentes gonadotropinas utilizadas en la superovulación del ganado bovino sobre la calidad embrionaria, llegaron a las siguientes conclusiones:

1. Los tratamientos con eCG (gonadotropina coriónica equina o PMSG) y FSH causan un incremento en los niveles de 17β estradiol plasmático, supresión de la secreción episódica de LH, ocurrencia prematura del pico preovulatorio de LH y la subsecuente vacuolización del nucleolo del ovocito en cierto porcentaje de hembras donantes.
2. Aunque casi imperceptibles y apenas medibles, esas desviaciones tienen un profundo efecto sobre la subsecuente capacidad de desarrollo del embrión.
3. La respuesta superovulatoria no afecta la viabilidad de los embriones transferidos en el día siete.
4. El mantenimiento de la fisiología reproductiva de las donantes es el mejor camino para reducir la producción de embriones no transferibles.

Diferentes resultados han sido reportados por varios investigadores que han utilizado de la anti-PMSG en los tratamientos superovulatorios. Dhondt, *et al.* (1978); Kummer, *et al.* (1982); Dieleman y Bevers (1987); Wang *et al.* (1987,1988); Dieleman *et al.* (1988c, 1989); Bevers *et al.* (1993); González *et al.* (1994a, 1994b) y Goulding *et al.* (1996), encontraron una mayor cantidad de ovulaciones, embriones transferibles y una reducción en el número de folículos al momento del lavado al aplicar la anti-PMSG. Sin embargo otros autores como: Greve, (1988); Zeitoun *et al.* (1988); Alfuraiji, *et al.* (1990); Callesen *et al.* (1990); Bak *et al.* (1991); Zeitoun *et al.* (1991) y Chagas *et al.* (1993), no obtuvieron ningún efecto sobre los parámetros descritos con anterioridad, aunque hay autores como Nakajima *et al.* (1994) que coinciden con el último planteamiento pero a diferencia de éste, comprobaron que hay una mayor producción de embriones de buena o de excelente calidad con la utilización de anti-PMSG en el ganado bovino de carne.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Trabajo Experimental

La experiencia se llevó a cabo en 2 establos de la Comarca Lagunera del estado de Durango, situados en el km 4 de la carretera Gómez Palacio- La Torreña. En los meses comprendidos entre febrero-abril y octubre-diciembre de 1996, en los que las temperaturas de la región no se consideran extremas

La Comarca Lagunera, se encuentra a 26° N y 102° y 104° O. Con una altitud media sobre el nivel del mar de 1100 a 1400 m (Schmidt, 1989). La precipitación pluvial promedio oscila entre los 200 y 250 milímetros. El clima de la región se clasifica como seco extremoso.

3.2 Animales Experimentales

Se utilizaron un total de 22 vacas Holstein en producción, las que fueron seleccionadas en 2 establos de la Región Lagunera en similares condiciones de explotación y manejo. Todas las hembras en el experimento tenían entre 2 y 4 partos y como requisito fundamental de selección debían tener su aparato genital aparentemente normal y con al menos dos ciclos estrales normales previos al tratamiento superovulatorio.

3.3 Manejo y Tratamiento de los Animales

Durante el desarrollo del trabajo experimental, los animales se mantuvieron bajo condiciones de manejo productivo rutinarias dentro de los establos.

A pesar de que el trabajo de campo tuvo una duración relativamente larga (seis meses) y que los animales se trabajaron en réplicas de dos, se homogenizaron las unidades experimentales en cuanto a las características individuales y al manejo, antes de iniciar el tratamiento y hasta la obtención de los embriones.

Los tratamientos superovulatorios se iniciaron entre el día 10 y 11 del ciclo estral (fase media luteal). Cada animal fue inyectado i.m. con 3,000 UI de PMSG (Folligon[®]: Intervet) y a las 48 horas invariablemente, se le indujo la luteólisis con inyección i.m. de 15 mg de un análogo de la PgF₂ α (Prosolvin[®] Intervet).

Al momento de iniciar el tratamiento se eliminaron aquellas hembras con cuerpos lúteos no definidos diagnosticados por vía transrectal.

A once de las vacas (grupo A) se les aplicó una dosis (2.0 ml) de anti-PMSG monoclonal (CIMA, Cuba) después del inicio del celo suficiente según el laboratorio para neutralizar 3000 UI de PMSG; los restantes once animales (grupo B) se les aplicó la misma dosis de anti-PMSG pero a las 24 horas después del inicio del celo.

En cada réplica (dos hembras) se inyectó anti-PMSG al azar a una de ellas a las 12 horas del inicio del estro, mientras que a la otra se le suministró a las 24 horas, de manera que al final del período experimental, quedaron formados dos subgrupos de 11 animales cada uno. (Grupo A: anti-PMSG a las 12 horas y Grupo B: anti-PMSG a las 24 horas).

3.4 Detección de Celos

Se realizó durante las 24 horas por personal capacitado, intensificándose la observación a partir de las 40 horas posteriores a la aplicación de la PG. Se tomó como el inicio del estro el momento en que las vacas permitieron ser montadas (standing heat) es decir, no al proestro. Todas las hembras con celo manifiesto fueron inseminadas con semen de toros de fertilidad probada a las 12 y 24 horas después del inicio del celo por técnicos inseminadores con experiencia en la actividad.

3.5 Muestreo Sanguíneo

La sangre para la obtención del suero fue tomada en cada uno de los animales por punción venicoccígea, cada 24 horas, a partir de la inyección de la PMSG y hasta veinticuatro horas después de la inyección de la PG. Posteriormente se redujo el intervalo cada 6 horas, hasta 8 horas antes del inicio del celo esperado (48 horas después de la inyección de $PgF2\alpha$). A partir de ese momento la toma de muestras se realizó cada hora y hasta 10 horas posterior a la presentación del celo. Las muestras sanguíneas fueron

centrifugadas y el suero obtenido se mantuvo en congelación hasta la determinación hormonal.

3.6 Determinación Hormonal

La determinación de LH se realizó en el laboratorio del Departamento de Reproducción de la U.N.A.M., en suero sanguíneo, por la técnica de radioinmunoanálisis.

Los niveles de progesterona fueron determinados por radioinmunoanálisis en fase sólida en las 5 muestras tomadas diariamente desde el inicio del tratamiento, hasta 24 horas antes de la presentación del estro para cada animal.

3.7 Recuperación y Clasificación Embrionaria

El lavado uterino, a base de solución fosfatada buferada (PBS) al dos por ciento de suero fetal bovino, para la obtención de los embriones, se realizó entre el día seis y el día ocho después de la primera I.A. por el método no quirúrgico. El día anterior a la fecha prevista para el lavado uterino se realizó la valoración de la respuesta superovulatoria por vía rectal.

La clasificación general de los embriones obtenidos en cada lavado uterino se realizó bajo observación estereoscópica según clasificación vigente de Linder y Wright (1983).

3.8 Análisis Estadístico

Para la caracterización del pico preovulatorio de LH se realizó un ANOVA simple del momento de ocurrencia del pico preovulatorio en relación con el inicio del estro (media $\pm$ sem).

Los valores obtenidos entre los grupos experimentales para evaluar la calidad embrionaria, los folículos grandes al momento del lavado, la tasa ovulatoria, y los ovocitos no fertilizados, fueron analizados por comparación de medias según la prueba de t-student.

Los valores porcentuales entre grupos para las vacas con y sin respuesta superovulatoria fueron analizados por χ^2 .

También se realizó un análisis de correlación entre los niveles de progesterona al inicio del tratamiento, con la calidad embrionaria, con los folículos grandes, con la tasa ovulatoria y con los ovocitos no fertilizados.

Los análisis estadísticos de todos los parámetros se realizaron utilizando el paquete computacional *Statgraphics Plus*® versión 6.0 (1992).

IV. RESULTADOS

4.1. Pico de LH y Dinámica de la Progesterona Durante el Tratamiento Superovulatorio

Se evaluó la aparición del pico de LH en horas con relación al inicio del celo en el total de los animales en la experiencia y se encontró una gran variabilidad fluctuando entre -4 a +7 h, pero la aparición del mismo fue en un 75 por ciento de los animales coincidente o después del inicio del celo, con una media general de 2.29 ± 1.20 h. Al tomar como punto de referencia la inyección de la $\text{PgF2}\alpha$, el pico de LH apareció con una media de 48.38 ± 2.21 h posterior a la aplicación.

Al evaluar los resultados por grupos experimentales (A y B) y la determinación retrospectiva de la aparición del pico de LH así como su relación con el tiempo transcurrido entre éste y la aplicación de la anti-PMSG, se pudo comprobar que el antisuero fue aplicado con una media de 11.00 ± 1.85 h y 20.55 ± 1.55 h después de la aparición del pico de LH para los grupos A y B respectivamente, es decir, alrededor de nueve horas más tarde para el grupo en el que la anti-PMSG se aplicó a las 24 horas después del inicio del celo (Grupo B). En la figura No. 1 se puede apreciar el perfil hormonal de una vaca con respuesta superovulatoria y con pico preovulatorio

de LH y el de una vaca sin repuesta superovulatoria y sin pico preovulatorio de LH.

Con relación a la dinámica de la progesterona durante el tratamiento superovulatorio con PMSG, hubo un incremento en la mayoría de las vacas al segundo día de la inyección de la gonadotropina (Fig. 2) manteniéndose hasta un día después de la aplicación de la PG (Fig. 3) y disminuyendo drásticamente al inicio del celo. En las vacas sin respuesta superovulatoria se observaron niveles basales de progesterona en el inicio del tratamiento. No se encontró correlación significativa entre los niveles de progesterona en este momento con las tasas ovulatorias y con la calidad embrionaria.

4.2. Respuesta Superovulatoria

Con relación a la respuesta superovulatoria se puede observar en tabla No. 1 de los resultados obtenidos que hubo una diferencia significativa ($P<0.05$) en cuanto al porcentaje de hembras que respondieron al tratamiento (63.6 porciento grupo A vs 72.7 porciento grupo B) y la media de cuerpos lúteos (7.28 ± 1.07 y 11.25 ± 1.15) para A y B respectivamente (Tablas No. 1 y 2). El porcentaje de animales que respondieron fue relativamente alta en ambos grupos, aunque se evidencia un porcentaje mayor en el grupo B.

La diferencia entre medias para folículos grandes al momento del lavado fue mayor para el grupo A (4.28 ± 0.36) siendo altamente significativa ($P<0.001$) en relación al grupo B (1.62 ± 0.40) (Tabla No.2).

4.3. Calidad Embrionaria

En relación a la calidad embrionaria, se evidenció que las hembras del grupo a las que se les administró la anti-PMSG a las 24 horas después del inicio del estro y a las 20.55 ± 1.55 horas con relación al pico de LH tuvieron una mayor cantidad de embriones grados uno y dos (5.10 ± 0.54) siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) en relación al grupo A (2.57 ± 0.57) en las que el antisuero fue aplicado en promedio a las 11.00 ± 1.80 h después de la aparición del pico de LH. Sin embargo se observó una cantidad de ovocitos no fertilizados significativamente mayor ($P < 0.05$) para el grupo B (2.0 ± 2.42 vs 0.42 ± 0.29) respecto al grupo A respectivamente (Tabla No. 3).

Respecto a los embriones no transferibles (grados tres y cuatro) recuperados no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla No. 3)

Tabla 1. Respuesta superovulatoria y ptje. de recuperación en vacas superovuladas con PMSG y anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del estro.

Grupo	n	vacas con respuesta	%	Cantidad c.l.	x c.l.	Ovocitos y embriones rec.	%
A							
Anti-PMSG 12 horas	11	7	63.6	51	7.28±1.17	36	70.58
B							
Anti-PMSG 24 horas	11	8	72.7*	90	11.2±1.15*	64	71.11

media±sem*($P<0.05$)

Tabla 2. Calidad de la respuesta superovulatoria en vacas superovuladas con PMSG y Anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del estro.

VARIABLE	GRUPO A	GRUPO B
CANTIDAD TOTAL DE C.L.	51	90
MEDIA DE C.L.	7.28±1.17	11.25±1.15*
GDES. FOLÍCULOS AL LAVADO	4.28±0.36	1.62±0.40**

Media ± sem

* $p<0.05$

** $p<0.001$

Tabla 3. Efecto de la inyección de anti-PMSG a las 12 y 24 horas del inicio del celo en vacas Holstein superovuladas con PMSG sobre la calidad embrionaria.

VARIABLE	GRUPO A	GRUPO B
LAVADOS	7	8
MEDIA OVOCITOS Y EMBRIONES	5.10	8.00
OVOCITOS NO FERTILIZADOS EMBRIONES	0.42± 0.29	2.00± 0.42*
TRANSFERIBLES	2.57± 0.75	5.10± 0.54*
EMBRIONES NO TRANSFERIBLES	2.14± 1.21	1.62± 0.75

Media ± sem * $P < 0.05$

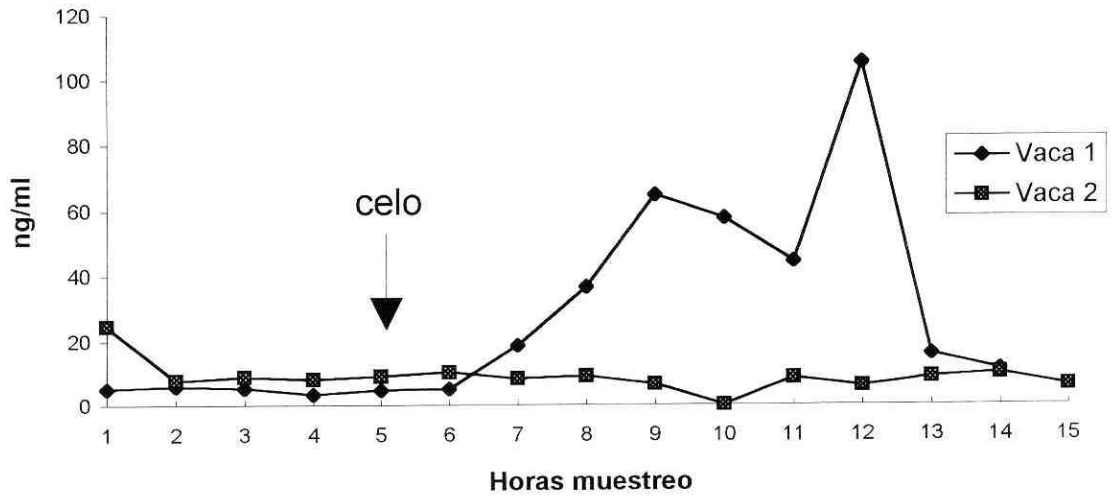


Figura 1. Dinámica de la LH sérica en dos vacas superovuladas con PMSG, con respuesta (1) y sin respuesta (2) superovulatoria.

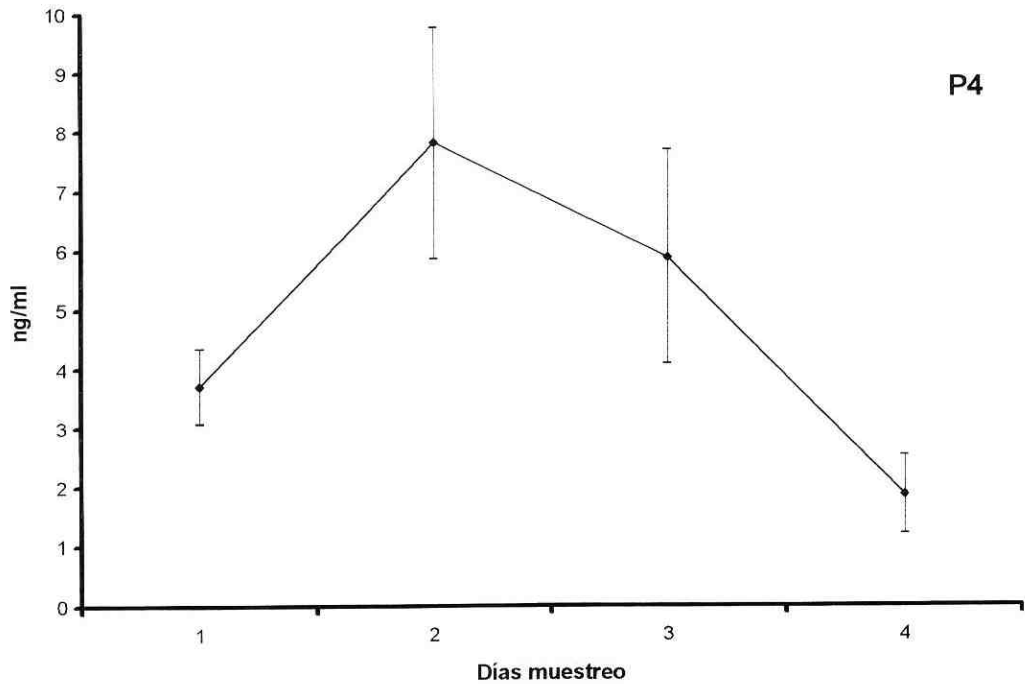


Fig. 2. Concentraciones séricas medias $\pm$ s.e.m. de P4 en el total de las vacas muestreadas después del tratamiento superovulatorio

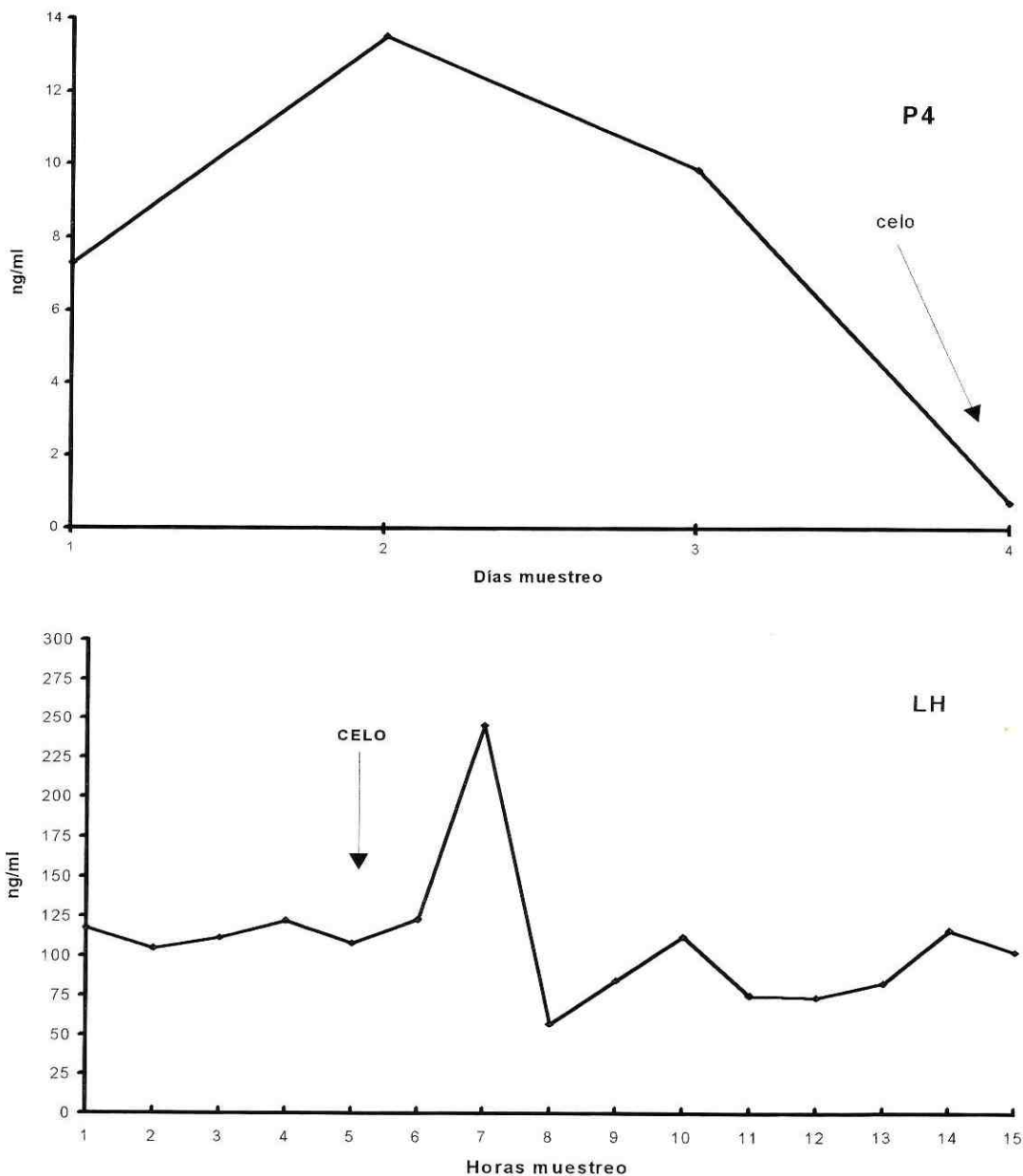


Fig 3. Patrones hormonales típicos de P4 y LH séricas en una vaca superovulada con PMSG muestreada al inicio del tratamiento superovulatorio y hasta 10 hrs después del inicio del estro.

V. DISCUSIÓN

En general los eventuales efectos benéficos del tratamiento superovulatorio con PMSG/anti-PMSG deben ser evaluados en términos de tasa ovulatoria, número de grandes folículos anovulatorios y folículos parcialmente luteinizados en los ovarios de las donantes después del tratamiento y antes del lavado uterino para la obtención embrionaria y por último la producción de embriones no transferibles y transferibles que quizá son los más importantes desde el punto de vista práctico.

Las características del pico preovulatorio de LH en relación al momento del ciclo estral en que ocurre, así como el perfil endocrino que presenta entre individuos, es materia de grandes dudas y contradicciones que hacen más difícil determinar en forma práctica el momento idóneo de la aplicación del anticuerpo contra la PMSG.

Los resultados de la caracterización del pico preovulatorio de LH después de la aplicación de la PG (48.38 ± 2.21) difieren de los planteados por Greve *et al.* (1984) quienes concluyen que la descarga preovulatoria de LH se presenta a intervalos menores (40.9 ± 8.40 h) después de la PG, pero coinciden con los presentados por Bevers y Dieleman (1987) que sostienen la gran variabilidad de la presentación del pico de LH pudiendo ser de 33 hasta 49 h después de la aplicación de la PG. El intervalo entre el inicio del celo y el

pico de LH (-4 a +7h) coincide con los presentados por Dieleman *et al.* (1993) los cuales tuvieron una variación de -4 a +12 h después del celo.

De los animales tratados el 16 porciento no presentaron pico preovulatorio de LH, lo cual es coincidente con los resultados presentados por Dieleman y Bevers (1987).

Los niveles de progesterona después de la aplicación de la PMSG tuvieron un perfil similar de acuerdo a resultados reportados por Dieleman y Bevers (1987), así como por Chagas *et al.* (1993) en los que describen el incremento en las concentraciones de progesterona después de iniciado el tratamiento superovulatorio y el descenso después de la aplicación de la PG y hasta la presentación del celo, aunque estos autores sí encontraron correlación significativa entre las niveles de P4 y la cantidad de embriones recuperados y ovocitos no fertilizados contrariamente a los resultados obtenidos aquí. Por otra parte hay autores que señalan que estas concentraciones no se ven afectadas significativamente en vacas superestimuladas (Nakajima *et al.*, 1994)

Aunque la respuesta superovulatoria no ha sido consistentemente relacionada con las vacas superovuladas con PMSG/anti-PMSG Bouters *et al.* (1983); Wang *et al.* (1987) y más recientemente González *et al.* (1994a, 1994b) y Goulding *et al.* (1996) plantean que hay un incremento del número de cuerpos lúteos en el momento del lavado en aquellas vacas tratadas con anti-PMSG lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) para el grupo B 11.25 ± 1.15 contra 7.28 ± 0.36 del grupo A, contrariamente a resultados previos obtenidos

por Greve (1988); Zeitoun *et al.* (1988); Alfuraiji *et al.* (1990); Nakajima *et al.* (1994); Bevers *et al.* (1993) y Chagas *et al.* (1993) quienes opinan que no hay un efecto significativo sobre las tasas ovulatorias. En el mismo sentido Vos *et al.* (1994) aducen que la administración de la anti-PMSG a tiempo fijo en relación con la inyección de PG o al comienzo del estro, puede producir resultados variables en relación con las tasas ovulatorias.

Resultados similares a los reportados por Dieleman *et al.* (1989); Bevers *et al.* (1993); Vos *et al.* (1994) y González *et al.* (1994a,1994b) se obtuvieron en el presente trabajo en cuanto a la cantidad de folículos grandes al momento del lavado, estos autores aseguran que hubo una significativa reducción de los quistes foliculares y de la cantidad de grandes folículos al momento de la recuperación embrionaria al administrar el antisuero en relación con el pico preovulatorio de LH. Pero difieren de los obtenidos por Nakajima *et al.* (1994) los que no encontraron una disminución significativa sobre este parámetro con el esquema superovulatorio propuesto.

En relación a la calidad embrionaria los resultados descritos por Dhondt, *et al.* (1978); Kummer, *et al.* (1982); Dieleman y Bevers (1987); Wang *et al.* (1987,1988); Dieleman *et al.* (1989); Bevers *et al.* (1993); González *et al.* (1994a, 1994b); Goulding *et al.* (1996) y Kuran *et al.* (1996) coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación en el sentido que hay una producción de embriones transferibles (grados uno y dos) mayor con el uso del antisuero contra la PMSG en la fase de la maduración final ovocitaria que cuando ésta no es utilizada o cuando se aplica demasiado precozmente respecto al pico preovulatorio de LH, pero difieren de los presentados por Greve *et al.* (1988); Zeitoun *et al.* (1988);

Alfuraiji, *et al.* (1990); Callesen *et al.* (1990); Bak *et al.* (1991); Zeitoun *et al.* (1991) y Chagas *et al.* (1993) los cuales no avalan beneficios al emplear el antisuero contra la PMSG.

A pesar de que Dieleman *et al.* (1989) obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de embriones degenerados y ovocitos no fertilizados recuperados, sugieren que los efectos adversos de la PMSG en la fase de la maduración final ovocitaria son de trascendental importancia en la obtención de ovocitos no fertilizados y embriones degenerados en aquellos animales sin anti-PMSG o cuando ésta es aplicada demasiado temprano en relación con el pico preovulatorio de LH. En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre las medias de embriones degenerados obtenidos en ambos grupos, aunque en relación a la media de ovocitos no fertilizados fue altamente significativa ($P < 0.001$) para el grupo B.

De forma general puede observarse en la literatura revisada que permanecen las contradicciones respecto al uso de la anti-PMSG en los tratamientos superovulatorios con PMSG, parece necesaria la realización de investigaciones más específicas, en las que el antisuero sea aplicado en relación a la aparición del pico preovulatorio de LH-celo tomando como predicción de este evento su inducción con tratamientos exógenos a tiempo fijo y su relación con la presentación del inicio del estro.

Las investigaciones recientes están encaminadas a encontrar soluciones para disminuir la gran variabilidad en la respuesta superovulatoria con cualquier esquema de tratamiento, en base a un mayor conocimiento de la dinámica folicular de la hembra bovina y muy específicamente al papel que tiene la dominancia folicular sobre la eficiencia de los esquemas

superovulatorios. Así se podrían mejorar los resultados aquí planteados para aquellos países o regiones que utilicen la PMSG en los programas MOET.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que:

La aparición del pico preovulatorio de LH después del estro presentó una marcada variabilidad individual lo que hace difícil determinar el momento exacto de la ocurrencia de este evento. No obstante, la aplicación del antisuero monoclonal contra la PMSG 24 horas después de la presentación del estro (standing heat) y 20.55 ± 4.66 h después del pico preovulatorio de LH muestra buenas perspectivas en la eficientización de la superovulación, al mejorar la calidad embrionaria y respuesta superovulatoria, al incrementar la cantidad de embriones transferibles recuperados y al disminuir la cantidad de folículos grandes al momento del lavado uterino para la recuperación embrionaria.

VII. LITERATURA CITADA

- Adams, G.P.** (1994) Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology* **41**:19-24.
- Alfuraiji, M.M., Broadbent, P.G., Hutchinson, J.J.M., Dolman, D.F. and Atkinson, T.** (1990) Superovulation using different doses of PMSG and monoclonal Anti-PMSG in cattle. *Theriogenology* **33**(1):186.
- Ali Dinar, M.A, Diskin, M.G., Mc. Dohagh, T. and Sreenan, J.M.** (1987) Oestrus and ovarian responses in repeatedly superovulated cows. *Theriogenology*. **27**:201.
- Almeida. A.P.** (1987).Superovulation in cattle, a combine treatment using synchromate B with either PMSG or FSH. *Theriogenology* **27**(1):203 .
- Armstrong, D.T.** (1993) Recent advances in superovulation in cattle. *Theriogenology* **39**:7-24.
- Armstrong, D.T. and Leung, P.C.** (1991) En: *The Physiological Basis of Superovulation. Seminar in Reproductive Endocrinology*. Thieme Medical Publishers N.Y., USA **8**: 219-231.
- Bak, A., Callesen, H. and Greve, T.** (1991) Use of PMSG antisera in superovulated dairy cows. Proc. 7th. ann. meet. assoc. Eur. Transf. Embr. 120 (abstr.).
- Beckers, J.F.** (1987) Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. *Theriogenology* **27**: 213.
- Bevers, M.M. and Dieleman, S.J.** (1987) Superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentration of progesterone, o-estradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in a number of preovulatory follicle. *Anim. Reprod. Sci.* **15**:37-52.
- Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Gielen J.T., Wurth, T.A., Janszen, B.P.M. Van de Broek, J. and Willemse, A.H.** (1993) Yield of embryos in PMSG-superovulated cows treated with anti-PMSG 6 or 18 hours after the peak of lutenizing hormone. *Veterinary Record* **132**: 8.
- Boland, M.P., Goulding, D. and Roche, J.F.** (1991) Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*. **35**: 5 -17.

- Bouters, R., Moyaert, I., Coryn, M. and Vandeplassche, M.** (1983) The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle: endocrinological changes and effect of timing of ovulation. *Zuchthygiene* **18**: 172-177.
- 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. Fertil.* **101**:583-591.
- Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P., Bak, A., Gotfredsen, P. and Holm, P.** (1990) Preovulatory plasma estradiol-17 β concentration and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. *Theriogenology* **34**:251-257.
- Callesen, H., Bak, A. and Greve, T.** (1992) Use of PMSG antiserum in superovulated cattle?. *Theriogenology* **38**:959-968.
- Campbell, G.M.** (1993) Efecto de la FSHp y PMSG-antiPMSG en vacas Holstein superovuladas. Trabajo para la obtención de diploma de maestría en ciencias. La Habana, Cuba. pp 42-45.
- Caral, J., Bernal, N., Solano, R., de Armas, R., Herrera, L. y Holy, L.** (1985) Comportamiento reproductivo de los animales después de la superovulación. Factores que influyen sobre el mismo. En: Resúmenes. VII Jornada Interna. CIMA. C. Habana. p. 53.
- Cole, H. H. and Cupps, P.T.** (1984) *Reproducción de los animales domésticos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 420.
- Convey, E.M., Dredschneider, E., Hafs, H.D. and Oxender, W.D.** (1971) Serum levels of LH, prolactin and growth hormone after ejaculation in bulls. *Biol. Reprod.* **50**:20.
- Chagas é Silva, J.N., Cidadão, M.R., Chamusco, S., Silva, J.N.C.** (1993) Superovulation in Fresian cows. Publicações do 5º Simposio Internacional de Reprodução Animal. Luso, Portugal. 30 de setembro a 2 de outubro. Volume 2.
- Chuppin, D. and Saumande, J.** (1979) New attempts to decrease the variability of ovarian response, to PMSG in cattle. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **19**:1489.
- Chuppin, D. and Procureur, R.** (1982) Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle effect of injection regime. *Theriogenology*, **17**:81.
- De Armas, R.R., Solano y Caral, J.** (1985) Transferencia de embriones en bovino. En: Resúmenes VII Jornada interna. CIMA C. Habana. Cuba. p. 55.
- de Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. and Kruip, Th. A.M.** (1991a) Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* **35**:527-535.
- de Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. and Kruip, Th. A.M.** (1991b) Follicular and oocyto maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology* **35**:537-546.

- Dhondt, D., Bowters, R., Spincemaille, J., Coryn, M. and Vandeplassche.** (1978) The control of superovulation in the bovine with PMSG-antiserum. *Theriogenology*, **9**:529.
- Dieleman, S.J. and Bevers, M.M.** (1987) Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge in time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. *J. Repr. Fertil.* **81**:533-542.
- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A. and Kruip, T.A.M.** (1988a) Developmental stage of embryos at day 6 and 7 in PMSG superovulated cows with or without monoclonal anti-PMSG administered shortly after of the preovulatory LH peak. 11th. International Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination. University College Dublin. Ireland. June 26-30. Volume 2 pp. 156.
- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A. and Kruip, T.A.M.** (1988b) Differentiated micromorphology of the preovulatory follicle population at ovulation in PMSG-superovulated cows with or without anti-PMSG administered shortly after the LH peak. 11th. International Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination. University College Dublin. Ireland. June 26-30. Volume 2 pp. 152.
- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A., Kruip, T.A.M., van Tol, H.T.M. and Blankenstein, D.M.** (1988c) Steroid profiles and micromorphology of the follicle population before ovulation on PMSG-superovulated with or without monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. 11th. International Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination. University College Dublin. Ireland. June 26-30. Volume 2 pp. 154.
- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A., Gielen, J.Th. 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**:473-485.
- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Vos, P.L.A.M. and de Loos, F.A.M.** (1993) PMSG anti-PMSG in cattle, a simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology* **39**:25-41.
- Domeki, I.** (1991) Endocrinology of embryo donor cows. *Japanese Journal of Animal Reproduction* **37**:5 (abstr.).
- Driancourt, M.A., Fry, R.C., Clarke, I.J. and Cahill, L.P.** (1987) Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. and Fertil.* **79**: 635-644.
- Driancourt, M.A. and Fry R.C.** (1988) Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* 66 (suppl.) 2: 9-20.

- Dufour, J.J., Cahill, L.P., and Mauléon, P. (1979) Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular population in sheep. *J. Repr. and Fertil.* **57**: 301-309.
- Ellendorff, F., Tavarne, F., Elsaesser, F. and Parvirizi, M. (1974) Endocrinology of parturition in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* **2**:323-334.
- Foote, R.H. and Ellington, J.E. (1988) Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* **29**: 114-123.
- Gielen., J.Th., Roerink, G.H., Atoon, R.E., Vonk Nordegraaf, C.A., Pasman, J., Hoeijmakers, M.J.H., Steeg, R.H.M., Coert, A., Aguer, D. and Nell, T. (1990) Use of PMSG plus neutra-PMSG in dairy cows treated repeatedly for superovulation. *Theriogenology* **33**:229 (abstr.).
- González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. (1994a) Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* **35**: 3 (abstr.).
- González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. (1994b) Increased ovulations rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* **41**: 1631-1642.
- Gordon, I. (1975) Problem and prospect in cattle transferish. *Vet. J.* **29**:21.
- Gordon, I. (1994) Oocyte Recovery and maturation. En: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (13rd. ed.) Cab. International. Cambridge, U.K. pp 30-38.
- Gordon, I. (1982) Synchronization of estrus and superovulation in cattle. En: *Mammalian Egg Transfer*. Adams C.E. (ed.) Boca Ratón, Fl. CRC Press. pp 63-80.
- Gospardowicz, D. (1972) Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotrophin PMSG. *Endocrinology*. **91**: 101.
- Goulding, D., Williams, D.H., Duffy, P., Boland, M.P. and Roche, J.F. (1990) Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrus cycle. *Theriogenology* **34**:767-778
- Goulding, D., Williams, D.H., Roche, F.J. and Boland, M.P. (1996) Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology*, **45**:765-773.
- Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. (1983) Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord. Vet. Med.* **35**:408.
- Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. (1984) Characterization of plasma LH profile in superovulated dairy cows. *Theriogenology* **21**:237.
- Greve, T., Bak, A. and Schmidt, M. (1988) Superovulation of dairy cattle effect of PMSG anti serum treatment. *Theriogenology* **29**:252.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Høier, R. and Assey, R. (1995) The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* **43**:41-50.

- Guilbault, L.A., Roy, G.L., Brassan, P. and Ennaji, A. (1987) Superovulation by continuous aortic infusion of FSH in cattle. *Theriogenology* **27**:233.
- Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G. and Roullier, P. (1991) Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* **91**:81-89.
- Hahn, J. (1992) Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, **38**:269-275.
- Hasler, J.F., Mc Caley, A.D., Shemerharn, E.C. and Foote, R.H. (1983) Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* **19**: 83.
- Herrler, A., Farris, E. and Nieman. (1990) A trial to stimulate insulin like growth factor levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* **33**: 160.
- Hibson, W.C. and Hansel, W. (1972) Plasma LH levels after ovariectomy, corpus luteum removal and estradiol administration in cattle. *Endocrinol.* **91**:185..
- Hinshelwood, M.M., Dierschke, D.J. and Hauser, E.R. (1986) The negative feedback effect of estradiol-17 β on secretion of luteinizing hormone in beef cows. *Theriogenology* **26**:28-32.
- Holy, L. (1987) En: *Biología de la Reproducción Bovina*. Editorial Ciencia y Técnica, 2a. Ed. La Habana Cuba.
- Huhtinen, M., Rainio, V., Aalto, J., Bredbacka, P. and Mäki-Tanila, A. (1992) Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* **37**:457.
- Jackson, G.L. Kuehl, D., Mc. Dowell, K. and Zaleski, A. (1982) Effect of hypothalamic differentiation on secretion of LH in the ewe. *Biol. Reprod.* **18**:808.
- Jillella, D. (1982) El transplante de embriones en ganado bovino. Folletos de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chapingo p 5-8.
- Kummer, V., Zrally, Z., Holcak, V., Veznik, Z., Schlegelova, J. and Hruska, K. (1982) Superovulation in Cattle: Effect of Goat anti-PMSG Serum. *Theriogenology* **14**: 383-390.
- Kuran, M., Broadbent, P.J. and Hutchinson, J.S. (1996) Bovine granulosa cell culture for assessment of potency and specificity of antibodies to pregnant mares' serum gonadotrophin. *Eur. Jour. Endocrinol.* **134**(4):497-500.
- Lauria, A., Genazzani, A.R., Oliva, O., Inaudi, R., Cremonesi, F., Monittola, C. and Aureli, G. (1982) Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* **66**:219-225.

- Leyva, O.C., Barrera, A. y Varisanga, M.** (1997) Manual de Transferencia de embriones no quirúrgica en ganado bovino. (En Impresión U.A.B.C. México) p. 27-35.
- Lermen, S.P., Thayne, W.V. Baker, R.D., Henchen, T., Meredith, L., 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.
- Linder, G.M., and Wright, R.W.J.** (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Anim. Meeting Inter. Embryo Transfer Soc.* 21-32.
- López, T.R., Aboites, M.G. y Martínez, G.F.** (1990) La biotecnología en la producción pecuaria en México. *Comercio Exterior.* **40**: 1153-1159.
- Madan, M.L.** (1990) Factors limiting superovulation responses in embryo transfer program among buffaloes. *Theriogenology* **33**(1): 280.
- Markette, K.L. Seidel, G.E. and Elsndel, R.P** (1985) Estimation of embryo transfer recipients from progesterone profile and return to estrus. *Theriogenology* **23**:45-62.
- Mc Gowan, R.M., Braithwaite, M., Jochle, W. and Maplettoft, R.J.** (1985) Superovulation of beef heifers with pergonal h.M.G.A. doses response trial. *Theriogenology* **24**: 173-174.
- Mc Neilly, A.S., Jonassen, J.A. and Fraser, H.M.** (1989) Supression of follicular development after chronic LH-RH inmuno-neutralization in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* **76**: 481-490.
- Miller, B.G., and Armstrong, D.T.** (1982) Infertility in superovulated inmature rats. Role of ovarian steroid hypersecretion. *Biol. Reprod.* **26**:861-868.
- Moneva, P. and Petrov, D.** (1989) The effects of various factors on the response to superovulation of donor cows. *Zhivotnov'dni-Nauki* **26**: 4 (abstr.).
- Moyaert, H., Bouters, R., Shonker, D.T., Wilderbeek, A.T.M., Caert, A. Caryn, M., and Vendeplassche, M.** (1985) The control of superovulation in the bovine with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*, **23**:210 (abstr.).
- Murphy, B.D. y Pescador, N.** (1997) Control de la la foliculogénesis bovina por factores endocrinos y paracrinos. *Memorias: Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina. AIBIR. México, D.F.* 19-22 mayo.
- Nakajima, A., Hiraizumi, S., Onodera, K., Suzuki, H., Kudo, Y. and Domeki, I.** (1994) The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. *Journal of Veterinary Medical Science.* **54**:1 (abstr.).
- Noriega, S.R., Martínez, B.S. y Flores, C.R.** (1995) Técnicas de Procesamiento de Embriones para la Transferencia en Bovinos. *Facultad de Medicina Veterinaria U.N.A.M. México, D.F.* pp 11-17.

- Papkoff, H.** (1974) Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotrophin. *Biochem. Biophys. Commun.*, **58**:398 (abstr.).
- Papkoff, H.** (1978) Relationships of PMSG to the pituitary gonadotrophins in control of reproduction in the cow. *Martinus Nijhoff. The Hage*, **73**-86.
- Pérez, E., Pedroso, R., Saumande, J. y De Armas, R.** (1987) Producción de anti-PMSG bovina. En: *Resúmenes Jornada Científica ACPA. C. Habana, Cuba.* p. 18.
- Peters, A.R. and Ball, P.J.H.** (1995) The ovarian cycle. En: *Reproduction in cattle*. 2nd. edition. Blackwell Science Ltd. (Ed.) Oxford, U.K. pp **22-45**.
- Petr, J., Mika, J. and Jílek, F.** (1990) The effect of PMSG-priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology*, **33**:1151-1155.
- Pierson, R.A. and Ginther O.J.** (1988) Follicular population during the estrus cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **16**:81.
- Piturru, P.G.** (1994) Embryo transfer in Piedmont cows after superovulation with PMSG/anti-PMSG and different FSH preparations in varying doses. *U.N.A.M. F.M.V.Z. BEASTCD* (abstr.).
- 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.
- Ramírez, G.J.A. y Miller, G.B.** (1995) Manual de Adelantos Biotécnicos en Reproducción Animal Aplicada a Bovinos de Carne. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua p. 6-10.
- Revah, I. and Butler, W.R.** (1996) Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Repr. Fertil.* **106**: 39-47.
- Roberge, S., Rieger, D. y Rawlings, N.C.** (1995) Periovulatory LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. *Theriogenology* **44**:59-70.
- Rommel, P. and Rebhock, F.** (1990) Comparative investigation on superovulation of high-yielding cows. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin.* **44**: 1 abstr.
- Rosado, A. y Rosales, A.M.** (1990) Maduración folicular en el mamífero: Atresia, determinantes bioquímicos. *Ciencia* **42**:81-97.
- Saumande, J.** (1980) Concentration of luteinizing hormone, oestradiol 17 β and progesterone in plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrin.* **84**: 84:425.
- Saumande, J. and Chuppin, D.** (1997) Superovulation a limit to egg transfer in cattle. *Theriogenology* **7**:41.
- Saumande, J. and Chuppin, D.** (1981) Production of antiserum in cattle: assay of inhibitory activity and use in superovulated heifers. *Theriogenology*, **15**:108.

- Saumande, J. and Chuppin, D.** (1987) The search for a reference method to test effectiveness of anti-PMSG in superovulatory treatment in cattle. *Theriogenology*, **27**:274.
- Schallenberger, E.H., Schams, D.C. and Zotmeier, K.** (1978) Response of LH and FSH (Folotropin) to administration of GnRH (Gonadoliberin) in pregnant and postpartum cattle including experiments with prolactin suppression. *Theriogenology* **10**:35.
- Schams, S., Menzer, Ch., Schallenberger, E., Hoffman, B. Hahn J. and Hahn, R.** (1978) Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and endocrine responses after application for superovulation in cattle. En: *Control of reproduction in the cow*. Sreenan, J.H. (ed.) The Hague, Martinus Nijhoff, pp 122-143.
- Schmidt, R.H.** (1989) The arid zones of México: Climatic extremes and conceptualizations of the Sonoran desert. *J. Arid. Env.* **16**:241-256.
- Seidel, G.E. Jr., Seidel, S.M.** (1981) The embryo Transfer industry. En: Brackett BG, Seidel G.E. Jr, (eds). *New Technologies in Animal Breeding*. New York: Academic Press. pp 41-80.
- Slennig, B.D. and Wheeler, M.B.** (1989) Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. *Theriogenology* **31**: 653-673.
- Thayer, K.M., Forrest, D.W. and Welsh, T.H.** (1985) Real time ultrasound of follicular development in superovulated cows. *Theriogenology* **23**:233.
- Varisanga, D.M.** (1993) Transferencia de embriones en el ganado bovino. Algunos factores que influyen en la respuesta superovulatoria de la donante y la gestación en receptoras. Tesis para la opción de Maestría en Reproducción Animal. La Habana, Cuba. pp 25-30.
- Vos, P.L.A.M., van der Schams, A., de Wit, A.A.C., Bevers, M.M., Willemse, A.H. and Dieleman, S.J.** (1994) Effects of neutralization of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. *J. Reprod. Fertil.* **100**:387-393.
- Wang, H., Ww, M., Zsu, K., Chagele, W. and Maplettoft.** (1987) Control of superovulation in the cow with a PMSG antiserum. *Theriogenology*, **27**:291.
- Wang, H., Ww, M., Patt, D., Murphy, D. and Maplettoft, R.** (1988) Superovulation in beef heifers with PMSG: effect of dose and monoclonal antibody to PMSG. *Theriogenology*, **29**:323.
- Warfield, S.J., Seidel, G.E. and Eldsen, R.R.** (1986) A comparison of two FSH regimens for superovulating cow and heifers. *Theriogenology* **25**:213.
- Wilson, J.M., Jones, A.L. and Miller, D.R.** (1990) Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology* **33**:349 (abstr.).

- Wiltmut, I.** (1980) El transplante de embriones en el mejoramiento del ganado bovino. *Rev. Mund. de Zootecnia*. **35**: 30-35.
- Yadav, M.C., Leslie, K.E. and Walton, J.S.** (1985) The onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. *Theriogenology* 23:237.
- Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Wise, T.H. and Maurer, R.R.** (1988) Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows. *Theriogenology*, **29**:339-345.
- Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Wise, T.H. and Maurer, R.R.** (1991) Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* **35**:3-8.