

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTOS DEL PRE-TRATAMIENTO CON SOMATOTROFINA RECOMBINANTE  
BOVINA (rbST) EN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA DE DONANTES  
HOLANDO URUGUAYAS A NIVEL COMERCIAL**

**Por:**



**MARTÍNEZ BARBITTA, Marcelo  
CELENTANO COMBA, Laura**

**TESIS DE GRADO, presentada como uno de los requisitos  
para obtener el Título de Doctor en Ciencias Veterinarias.  
(Orientación PRODUCCIÓN ANIMAL)**

**MODALIDAD Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2008**

084 TG

Efectos del pre

*Martinez Barbitta, Marcelo*



FVI27564

# PÁGINA DE APROBACIÓN

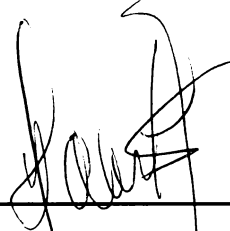
## TRIBUNAL:

**Presidente:**  
**Dr. Danilo Fila**



---

**Tutor:**  
**Dr. Daniel Cavestany**



---

**Tercer Miembro:**  
**Prof. Juan Calvo**



---

## AUTORES:

**Br. Marcelo Martínez Barbitta**

---

**Br. Laura Celentano Comba**

---

**Jueves 27 de marzo de 2008**

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias, que siempre estuvieron con nosotros en todo momento, fueron fruto de inspiración e invaluable apoyo durante toda la carrera.

Los autores reconocen la destacable participación de Álvaro Fernández Tubino, sin el cual este trabajo no podría haber sido realizado. A través de sus actividades de docencia nos hizo entusiasrnarnos en la temática y a través de su tutela se pudo finalmente llevar a cabo.

A la Ganadera "San Alberto", cabaña reconocida y pujante, a sus responsables, quienes hicieron posibles la labor con todas las libertades y comodidades.

Al Dr. Daniel Cavestany, por tomar en sus manos un trabajo pensado e iniciado por otros y hacerlo suyo.

Al Sr. Decano Dr. Roberto Kremer por haber dado una luz, cuando el camino parecía sombrío e incierto, entre tantas diferencias y conflictos.

A todos los docentes de la Facultad y colaboradores, que de una forma u otra, formaron lo que somos hoy, y no solo desde el punto de vista académico, sino también moral, personal y social.

A todos los compañeros que hicieron que esta carrera sea tan gratificante como lo ha sido, conociendo verdaderos amigos y referentes.

# TABLA DE CONTENIDO

	Pág
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b>	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	III
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b>	IV
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. SUMMARY</b>	1
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>4. REVISIÓN BIBLOGRÁFICA</b>	5
<b>4.1. El Proceso de la Foliculogénesis</b>	5
<b>4.1.1. FSH, LH y Ondas Foliculares</b>	7
<b>4.1.2. Las inhibinas, activinas y folistatina</b>	13
<b>4.1.3. Regulación subcelular (molecular) del desarrollo folicular</b>	15
<b>4.1.4. El Sistema IGF</b>	15
<b>4.2. Tratamientos Superovulatorios en el Ganado Vacuno</b>	19
<b>4.2.1. Factores que Afectan las Respuestas Superovulatorias</b>	20
<b>4.2.1.1. Tipos de Gonadotrofinas Empleadas</b>	20
<b>4.2.1.2. Vías de Administración</b>	22
<b>4.2.1.3. Efecto raza y Ambiente en la Respuesta Ovulatoria</b>	23
<b>4.2.1.4. Inducción de la Ovulación</b>	23
<b>4.2.1.5. Dinámica Folicular y Superovulación</b>	24
<b>4.2.1.6. Control del Desarrollo Folicular y Superovulación</b>	25
<b>4.3. Introducción a la GH</b>	28
<b>4.4. Efectos de la GH</b>	30
<b>4.4.1. Influencia sobre la Salud de la Ubre</b>	31
<b>4.4.2. Efectos sobre Desórdenes Metabólicos</b>	32
<b>4.4.3. Efectos sobre la Reproducción</b>	33
<b>4.4.3.1. Ensayos con bST en Protocolos de Superovulación</b>	40
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
<b>6. RESULTADOS</b>	43
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	47
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	49
<b>9. ANEXO I - RESULTADOS DEL ENSAYO EN FORMA TABULADA</b>	67

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

		Pág
Figura 1	Desviaciones foliculares y sus relaciones con las concentraciones de FSH y perfiles de crecimiento folicular	9
Figura 2	Esquemática representación de la regulación neuroendócrina de la FSH	14
Figura 3	Diagrama ilustrativo de las funciones de las IGFBPs como portadores de IGF en suero y moduladores de su acción a nivel tisular	16
Figura 4	Representación del eje somatotrófico-gonadotrófico-gonadal	29
Figura 5	Diagrama representativo de los posibles efectos del sistema IGF en la función ovárica bovina	34
Figura 6	Diagrama del Protocolo de Superovulación empleado	42
Figura 7	Gráfico de medias y desviaciones estándar para la variable porcentaje de estructuras colectadas en estado de degeneración	47
Cuadro I	Resumen de datos para la variable cantidad de ovocitos colectados	44
Cuadro II	Resumen de datos para el parámetro analizado porcentaje de embriones viables	44
Cuadro III	Resumen de datos para la variable número de CL palpados al momento de la colecta	45
Cuadro IV	Resumen de datos para porcentaje de estructuras infértiles colectados	46
Cuadro V	Resumen de datos para la variable porcentaje de estructuras degeneradas del total obtenido	46

## **1) RESUMEN**

El objetivo del presente ensayo es evaluar el efecto del pre-tratamiento con rbST en un protocolo de superovulación convencional de tipo comercial, a través de dosis decrecientes de FSH-p para un total de 400 mg, analizando la respuesta al tratamiento sobre sesenta donantes de raza Holando Uruguayo de alta producción, entre 85 y 150 días posparto, de 5 a 10 años de edad, con un promedio 3 de condición corporal y sin antecedentes de infertilidad. En el Día 0 del protocolo de superovulación, el Grupo bST recibió 500 mg vía SC de rbST a diferencia del grupo testigo. Las donantes fueron inseminadas aleatoriamente con semen de sanidad y fertilidad conocida. Los parámetros a evaluar fueron: total de estructuras colectadas, porcentaje de embriones viables, porcentaje de donantes con ningún embrión viable, media y mediana de cuerpos lúteos palpados y embriones viables, no hallando en ningún caso diferencias significativas de acuerdo al nivel de significación establecido previamente. Se puede concluir que, según los resultados encontrados en el presente ensayo, no se ha demostrado que los tratamientos con rbST en protocolos superovulatorios favorezcan la respuesta en forma cuantitativa ni cualitativa, medida a través de la cantidad y/o calidad de las estructuras encontradas.

## **2) SUMMARY**

The objective of the present rehearsal is to evaluate the effect of the pre-treatment with rbST in a protocol of conventional superovulation of commercial type, through falling dose of FSH-p for a total of 400 mg, analyzing the answer to the treatment on sixty donors of race Uruguayan Holstein of high production, between 85 and 150 days postpartum, of 5 to 10 years of age, with an average 3 of corporal condition and without infertility antecedents. In the Day 0 of the superovulation protocol, the Group bST received 500 mg via rbST SC contrary to the control group. The donors were inseminated aleatorily with semen of sanity and well-known fertility. The parameters to evaluate were: total of collected structures, percentage of viable embryos, donors' percentage with any viable embryo, mediates and medium of corpora lutea and viable embryos, not finding previously in any case significant differences according to the established significance level. In conclusion, according to the opposing results presently rehearsal, it has not been demonstrated that the treatments with rbST in protocols superovulation favor the answer in quantitative neither qualitative form, measure through the quantity and quality of the opposing structures.

## **3) INTRODUCCIÓN**

La historia de la transferencia de embriones como técnica multiplicadora de animales de elevado valor genético se remonta a fines del siglo XIX cuando Walter Heape en 1890 reportó los primeros nacimientos de productos obtenidos por transferencia de embriones en mamíferos. Años después, Biedl et al. (1922), Nicholas (1933), Pincus & Enznann (1934), Chang (1948) y luego Dowling (1949) comunican resultados exitosos en transferencia embrionaria en conejos. En la especie bovina la primera comunicación exitosa fue realizada por Willet y col. en 1951.

La industria internacional de la transferencia de embriones comercialmente se estableció firmemente durante la década de los 70. Inicialmente, las técnicas para recuperar y transferir embriones en el ganado eran quirúrgicas, sin embargo, a fines de la década de los 70's la técnica fue sustituida por la no quirúrgica o transcervical. La criopreservación exitosa de embriones se hallaba extendida a principio de los años 80, le siguieron la producción de embriones in-vitro, la transferencia directa de embriones congelados y el sexaje de embriones. La adopción de etilenglicol como agente crioprotector ha simplificado los procedimientos de descongelado-transferencia con embriones congelados.

El número de embriones recuperados anualmente no ha crecido en forma apreciable durante los últimos 10 años en América del Norte y Europa pero sí ha habido un crecimiento significativo del número de embriones transferidos comercialmente en América del Sur. Evaluando los últimos 5 años, en base a los reportes anuales de la Internacional Embryo Transfer Society (IETS), la producción de embriones en Sudamérica ha aumentado en un 50%, principalmente a partir de los avances desarrollados en Brasil, mientras en América del Norte la evolución no alcanzó el 10% y en Europa el descenso superó el 20% desde 1999 hasta el reporte de diciembre de 2004 (Thibier, 1999; 2004). El último reporte indica una reducción en el número de embriones in-vivo colectados de un 15%, cifra contrarrestada con la obtención de embriones viables in-vitro, que en Sudamérica aumentó considerablemente los años precedentes, superando los 60.000 embriones colectados y transferidos (Thibier, 2004). Dentro de América del Norte, la actividad de transferencia de embriones ha sido relativamente constante en el ganado Holstein, pero ha habido un crecimiento importante en la raza Aberdeen Angus concomitantemente con la disminución en algunas otras razas de carne.

A nivel nacional no se encuentra información centralizada, cierta y concluyente de la actividad, así como ocurre en muchos otros países (India y Rusia entre otros) por lo cual, los datos aportados a los organismos internacionales de referencia son parciales e incompletos y subestiman el desarrollo de esta industria a nivel nacional (Thibier, 2004).

La exportación e importación de embriones congelados se ha vuelto una industria bien establecida que moviliza grandes divisas, gobernada por regulaciones sanitarias específicas. La tecnología hoy está bien establecida y se producen casi 600.000 embriones anualmente a nivel mundial para ser transferidos a partir de vacas seleccionadas y superovuladas. De ellos, el 82% se producen por tecnología in-vivo, presentándose un gran auge en la producción de embriones in-vitro en los últimos años (Thibier, 2004).

El movimiento internacional de embriones está sujeto a perturbaciones súbitas y dramáticas, como ejemplo reciente se puede mencionar aquel ocurrido en el año 2001 con el brote de Fiebre Aftosa en Gran Bretaña que modificó trascendentemente el modelo comercial empleado hasta entonces. Es probable que las actuales tendencias hacia el proteccionismo en pro del bienestar animal influyan de manera importante

sobre los procedimientos empleados y juegan un rol fundamental en la industria de la transferencia de embriones del futuro (Hasler, 2003).

Varias compañías en América del Norte clonan ganado en la actualidad comercialmente. El sexaje del semen bovino con el uso de citómetros de flujo ha adquirido relativa exactitud en ensayos de campo, pero el semen sexado está actualmente disponible en sólo unos pocos países y en una base sumamente limitada. Hasta el momento, todos los programas que involucran la producción de ganado transgénico son experimentales (Hasler, 2003).

La PCR está siendo utilizada como tecnología para el sexaje de embriones. El sexaje del semen es una tecnología establecida y probablemente será usada en un futuro cercano, sobre todo en los sistemas de producción de embriones in-vitro. La clonación por transferencia nuclear de células somáticas se ha logrado técnicamente. Sin embargo, ésta es una tecnología cara e ineficaz que está usándose principalmente por la industria farmacéutica. (Mapletoft & Hasler, 2005).

El empleo de la producción in vitro de embriones (PIV) en investigación y en programas de mejoramiento genético se intensificó en los últimos años. Ello posibilitó el mejor aprovechamiento de las gametas femeninas. Los resultados obtenidos con el uso de PIV condujeron a llevar a cabo estudios con el fin de aumentar el número de ovocitos de buena calidad obtenidos por distintos métodos (aspiración, disección) a partir de ovarios de vacas vivas o provenientes de matadero (Thibier, 2004).

La superovulación es una llave dentro de la transferencia de embriones en ganado, pero a pesar de que han pasado casi 60 años desde el primer nacimiento de un ternero por transferencia de embriones y han surgido nuevas tecnologías dentro de la industria en la última década, el procedimiento básico de superovulación no ha tenido mejoras significativas durante los últimos 20 años. En los años intermedios han habido avances tanto a nivel científico como metodológico en el entendimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares de la interacción de las gametas y en la producción de hormonas por aislamiento y recombinación de ADN, pero todavía estos avances no se han traducido en mejoras en la práctica o el éxito de la superovulación (Armstrong, 1993).

Se han estudiado tratamientos hormonales para aumentar el número de folículos ováricos, así como también el porcentaje de recuperación de ovocitos a partir de ellos. Las gonadotrofinas hipofisarias (hormonas foliculoestimulante o FSH y luteinizante o LH) son las que proveen el impulso endocrino primario para el crecimiento folicular y control del ciclo estral y su utilización en programas de superovulación presenta inconvenientes, ya sea respuesta variable de los animales estimulados, contaminación de la preparación con compuestos hormonales no deseados e inadecuada vida útil de las hormonas. Se volvió necesario el estudio de otros tratamientos distintos a los convencionales, como ser la utilización de factores locales (IGF, TGF así como citoquinas) y sistémicos. Entre los factores sistémicos que influyen profundamente la función ovárica y el paso de los folículos por sus diferentes estadios de desarrollo se encuentra la hormona del crecimiento (GH), utilizada en los últimos años como



alternativa para aumentar el número de folículos ováricos disponibles para la obtención de gametas femeninas.

Muchas revisiones en superovulación han puesto énfasis en los diferentes factores que contribuyen a la gran variabilidad en la respuesta ovulatoria luego de la estimulación gonadotrópica. Sin embargo, la proporción de ovulación es solamente una de las variables que influyen en el rendimiento de los embriones. El mejor indicador del éxito de un programa de superovulación es el número de terneros nacidos vivos por donante en un determinado período de tiempo. Esto es determinado por la interacción de varios factores (Armstrong, 1993):

- a) Factores que influyen en la respuesta superovulatoria de las donantes.
- b) Factores que influyen en las tasas de fertilización y viabilidad de los embriones.
- c) Factores relacionados al manejo animal.

Un problema que surge frente a los protocolos de superovulación es la enorme variabilidad en la respuesta animal, entre individuos y dentro del mismo animal (Monniaux et al., 1983; Rieger et al., 1988). Esto ha limitado la eficacia en la transferencia de embriones debido a la ausencia de una respuesta predecible y fiable para la producción de embriones (Gordon, 1982; Boland et al., 1991). Se ha propuesto que las dos variables más importantes para la obtención de un número grande y predecible de embriones viables estarían dadas por la administración de preparaciones de hormonas adecuadas y la existencia de folículos gonadotrófico-sensibles presentes en los ovarios al momento del estímulo hormonal (Moor et al., 1984; Murphy y col., 1984).

La somatotrofina bovina (bST) es una hormona pituitaria de efectos múltiples en el crecimiento y diferenciación celular (Gluckman et al., 1987). La rbST (somatotrofina recombinante) se ha utilizado para aumentar el crecimiento animal y la lactación (Bauman, 1992) por ejemplo, la producción de leche de vacas inoculadas con bST fue superior a las testigo en un 10% a un 20% según trabajos de Peel et al. (1987).

Con el empleo de somatotrofina bovina durante la lactancia las producciones de leche aumentan, lo que trae una mejora de la eficacia productiva del sistema. Las investigaciones que apuntaban a esta hormona se iniciaron en los años 30 y actualmente, todo apunta a evaluar los factores animales relacionados a la nutrición, bioenergía, metabolismo y salud y aquellos tendientes al consumidor como son los factores relacionados a la calidad del producto, factores industriales y seguridad del mismo. En conjunto, la bST tiene acción sobre toda la homeostasis involucrando muchos procesos fisiológicos. Los efectos directos involucran las adaptaciones en muchos tejidos y el metabolismo de toda clase de nutrientes: hidratos de carbono, lípidos, proteínas y minerales. Los mecanismos incluyen alteraciones sobre enzimas importantes, intracelularmente sobre los sistemas de trasducción y la respuesta de los tejidos a los signos de homeostasis. Los efectos indirectos involucran a la glándula mamaria y gónadas y se piensa que es mediado por el sistema del factor de crecimiento insulino-símil (IGF). Los cambios específicos incluyen aumentos en la síntesis de leche y el mantenimiento reforzado de células secretorias. Los efectos indirectos son modulados por el ambiente e involucran especialmente el estado nutritivo. Esta

modulación es un componente central permitiéndole a la bST jugar un papel importante regulando la utilización de nutrientes en un rango de situaciones fisiológicas. El uso comercial en los EEUU comenzó en 1994, y la adopción ha sido extensa. De la perspectiva del consumidor, la bST tenía un especial interés en los resultados sobre los productos obtenidos y sus consecuencias sobre los consumidores. Sin embargo, la introducción de la bST no ha tenido impacto en el consumo de leche, y las leches etiquetadas como "libres de rbST" ocupan un mercado del nicho menor. De la perspectiva del productor, el uso comercial verificado por estudios científicos, aumentó la rentabilidad de los tambos comerciales. En conjunto, la bST es un factor de regulación homeostático importante que regula la división de nutrientes, y el sistema bST/IGF juega un papel importante en la respuesta animal de acuerdo a las situaciones fisiológicas (Bauman, 1999a).

Se ha intentado mejorar la respuesta superovulatoria utilizando gonadotrofinas en diferentes preparaciones y protocolos con pretratamientos con bajas dosis de gonadotrofinas, y han logrado relativo éxito en las respuestas ovulatorias y en el número de embriones transferibles recuperados (Monniaux et al., 1983, Moor et al., 1984, Murphy et al., 1984, Price, 1991).

Ninguno de los protocolos de superovulación actualmente empleados a nivel comercial en el ganado vacuno controla la población de folículos gonadotrofico-sensibles al momento del estímulo exógeno, y por consiguiente es una fuente primaria de alta variabilidad en la respuesta al protocolo (Moor, 1984; Murphy et al., 1984; Bellows et al., 1991; Price, 1991). Según estudios de Gong y col. (1991), el tratamiento con bST aumenta el número de folículos antrales de 2-5 mm de diámetro en vacas adultas. Se ha sugerido que la población de folículos ováricos de buena calidad > 1,7 mm de diámetro presentes al momento del tratamiento con gonadotrofinas podría tener un rol muy importante determinando la superovulación subsiguiente (Monniaux et al., 1983). Por consiguiente, si los pequeños folículos inducidos por el tratamiento con bST son funcionalmente saludables, el aumento en el número de folículos antrales inducidos por el tratamiento con bST podría reforzar la respuesta superovulatoria.

Con base en los estudios antes mencionados y teniendo en cuenta los múltiples efectos a nivel local y sistémico de la somatotrofina bovina, el objetivo del presente ensayo es evaluar el efecto del pre-tratamiento con rbST en un protocolo de superovulación, sobre los diferentes parámetros de respuesta al tratamiento en vacas Holando Uruguayo de alta genética en lactación.

## **4) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1) EL PROCESO DE LA FOLICULOGÉNESIS**

La disponibilidad de ovocitos es un factor limitante en el desarrollo de nuevas técnicas reproductivas. La duración del período de fertilidad en la vida de las hembras bovinas está determinada por el tamaño del pool de folículos primordiales formados

durante la fase fetal y por el rango o proporción de depleción de dicho pool luego "del nacimiento (Smitz & Cortvrindt, 2002).

En casi todas las especies de mamíferos no hay división mitótica de la célula germinal femenina después del nacimiento, de manera que, el número de oocitos presentes al nacimiento representa el total disponible durante la vida del animal. En el feto bovino, la ovogonia se desarrolla de las células primordiales germinales que han migrado hasta el ovario durante la embriogénesis temprana y prolifera alrededor del día 50 hasta el día 130 de la gestación. Un proceso de degeneración ovogonial comienza alrededor del día 95 de la vida fetal y la mayoría de los oocitos producidos durante este período (60% o más) son eliminados del ovario antes del parto.

Un segundo evento de desarrollo se inicia a los 80 días de la vida fetal cuando la ovogonia inicia la meiosis. Este proceso se detiene en todos los ovocitos en el estadio diploteno de la profase meiótica. Acompañando estos cambios nucleares está la formación de los folículos primordiales, la diferenciación de una capa de células aplanadas que los envuelven conocida como células de la granulosa, el establecimiento de una lámina basal rodeando la granulosa y la diferenciación de una capa de células de la teca exterior a la lámina basal.

En el modelo bovino, los oocitos primordiales expresan un factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) (Van Wezel et al., 1995) el cual puede interactuar con las células de la granulosa desde los folículos preantrales.

Cuando la capa de células de la granulosa se transforman de aplanadas a cuboidales los folículos son clasificados como "transitorios o intermedios". La teca interna comienza su diferenciación, y al folículo en desarrollo se le denomina folículo primario. Un folículo primario está caracterizado por estar rodeado de células de la granulosa de forma cuboidal dispuestas sobre una membrana basal. Esta es la primera fase de crecimiento. La formación de la zona pelúcida durante la transformación del folículo primordial en folículo primario es otro punto de referencia distintivo. La zona pelúcida y la capa interna de la teca son formadas cuando los folículos están en la fase primaria (Lundy et al., 1999).

Los folículos primarios están localizados en una fina capa de 2 mm pobremente vascularizada debajo de la túnica albugínea. Los folículos que muestran inicio de crecimiento son encontrados en el borde corticomedular, el cual es altamente vascularizado (Van Wezel & Rodgers, 1996). Las fases tempranas de crecimiento, incluyendo la transición de primordial a folículo primario es gonadotrófico independiente siendo regulado principalmente por factores intraováricos. Su crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario, se completa por la proliferación de las células de la granulosa. Los folículos en estos dos estadios se describen colectivamente como preantrales y pueden ser identificados como oocitos primarios en crecimiento, rodeados por 6 o 7 capas de células de la granulosa. Las células tecales son recluidas desde el intersticio del estroma y pueden ser reconocidas como células individuales en la membrana basal (Hirshfield, 1991; Lundy et al., 1999; Parrott & Skinner, 2000). En cuanto los folículos alcanzan la segunda fase (2 capas) una distinta capa de células

tecales es formada en todos los folículos (Lundy et al., 1999). El crecimiento del folículo preantral puede ser dividido en dos fases. Una fase vascular y otra avascular. Después de multiplicar 7 u 8 veces el número de células de la granulosa, se forma una cavidad, diferenciándose la mural y el cúmulo de células. La teca externa es formada por una capa altamente vascularizada, proveyéndole al folículo factores endocrinos sistémicos que le permiten una expansión volumétrica exponencial.

La sobrevivencia folicular y la competencia del oocito son obviamente independientes. El oxígeno suministrado a las capas más profundas del folículo es dependiente de los requerimientos de las células somáticas las cuales están manejadas dentro de la proliferación por las cantidades relativas de insulina, IGFs y FSH.

Al analizar la respuesta superovulatoria en el ganado surge la pregunta: ¿Todos los oocitos de los folículos primordiales tienen la capacidad de ovular? Recientes observaciones realizadas por de Bruin (2001) indican que un proceso necrótico es la base de la atresia en el resto de los folículos.

#### **4.1.1) FSH, LH y Ondas Foliculares**

Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular (Evans & Canty, 2004b).

Los folículos primordiales inician su crecimiento y diferenciación en un proceso aparentemente continuo pero irreversible que es conocido como foliculogénesis. Cuando un folículo primordial entra al grupo de crecimiento, este será conducido a uno de dos hechos: la degeneración por atresia (sufrida por el 99% o más de los integrantes) o la ovulación alcanzada por muy pocos. El intervalo requerido para la activación de un folículo primordial durmiente hasta su ovulación ha sido estimado en 180 días.

El crecimiento folicular es caracterizado, en varias especies, por un modelo de ondas que ocurren durante el curso normal de los ciclos estrales del ganado (Evans, 2003). Se ha demostrado que más del 95% de los ciclos estrales bovinos están compuestos de dos o tres ondas foliculares (Adams, 1999; 1994). Se han informado ciclos de una sola onda en vaquillonas al momento de la pubertad y en vacas adultas durante los primeros ciclos posparto. Los ciclos de cuatro ondas se observaron en ciertos estudios en razas indicas (Rhodes et al., 1995).

La onda folicular se caracteriza por la emergencia sincrónica de un grupo o conjunto de folículos, dentro de éstos, se selecciona uno que se convierte en el folículo dominante, sufriendo los restantes el proceso atresico (folículos subordinados) (Adams et al., 1992, Evans & Canty, 2004b).

El crecimiento de los folículos antrales desde unas 300 µm a 5 mm de diámetro dura aproximadamente 30 días. El crecimiento subsiguiente, hasta 15 a 20 mm de

diámetro, es rápido y se produce por un modelo de ondas sucesivas durante 4 a 6 días. El crecimiento antral temprano (hasta 4-5 mm de diámetro) se considera gonadotrófico independiente, pero el crecimiento siguiente es regulado por gonadotropinas, particularmente la hormona foliculo estimulante o FSH. Numerosos factores locales también regulan el crecimiento folicular, los miembros de la familia de los factores de crecimiento de tipo transformador TGF $\beta$  (incluso las inhibinas, activinas y folistatinas) y los factores de crecimiento de tipo insulínico IGFs son las de mayor trascendencia. Los esfuerzos recientes por entender el desarrollo folicular incluyen estudios a nivel intracelular de factores moleculares que regulan la proliferación o regresión de células del foliculo.

El **reclutamiento** es un proceso por el que, bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (3-4 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. La **selección** es un proceso por el cual un único foliculo evade la atresia y adquiere competencia para alcanzar la ovulación. La **dominancia** es el medio por el cual el foliculo seleccionado inhibe el reclutamiento de una nueva serie de folículos.

El reclutamiento no ha recibido la misma atención investigativa como la dominancia folicular y la ovulación. Grupos, más que folículos aislados, son reclutados y este proceso se relaciona con cambios medibles de la FSH circulante. Factores intraováricos estimulados por la FSH están involucrados en el proceso de reclutamiento folicular y los IGFs (factores de crecimiento ligados a la insulina) y sus proteínas de enlace (IGFBPs) han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH.

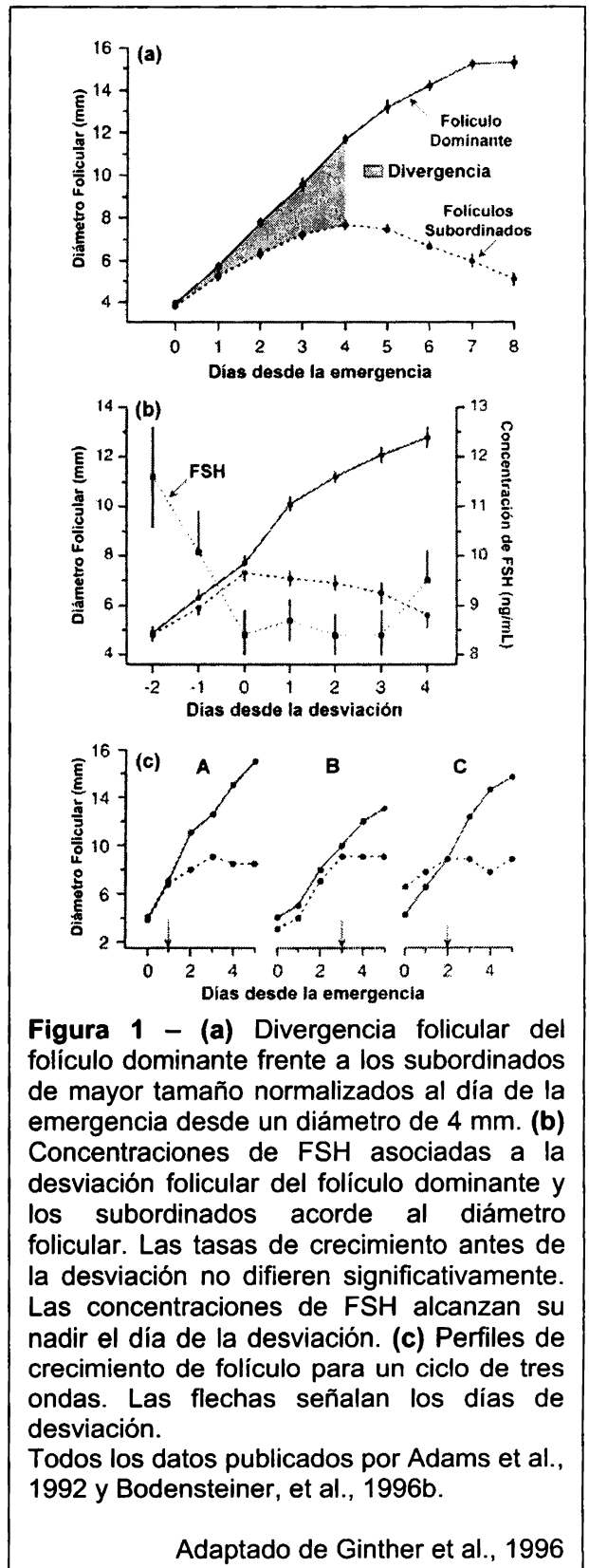
El día de emergencia folicular es considerado el primer día de la onda folicular cuando el grupo creciente de folículos es analizado por ultrasonografía, detectándose aquellos de aproximadamente 5 mm de diámetro. La selección folicular produce la disminución en el número específico de folículos activos que llegan a ovular y se produce cuando el foliculo dominante se ha seleccionado de los folículos subordinados y es observada como una diferencia de tamaño (Evans, 2003). Esta divergencia en el crecimiento se denomina **desviación** (ver Figura 1 – a y c, Ginther et al., 2003) y es coincidente con la decreciente concentración plasmática de FSH (ver Figura 1 - b) y la sensibilización del foliculo dominante ante la hormona luteinizante (LH) (Mihm & Bleach, 2003). El tiempo de desviación es definido como el comienzo de una gran diferencia en los rangos de crecimiento entre los más grandes folículos, cuando el segundo foliculo más grande alcanza su máximo diámetro (Ginther et al., 1996a). Cada desviación de los folículos es un gran evento en el proceso de selección.

Estudios encaminados a estudiar las ondas foliculares durante varios años encontraron que algunos de los factores que afectan el número de ondas del ciclo estral incluían la dieta (Murphy et al., 1991b), la parición y el estado de la lactancia. Además, el diámetro logrado por el foliculo dominante es afectado por la fase del ciclo estral (Ginther et al., 1989) y la preñez (Ginther et al., 1996b).

La formación de la cavidad del foliculo que forma el antro líquido es el siguiente estadio en su desarrollo. Los folículos antrales existen en el ovario bovino con

diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm. Generalmente se acepta que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotrofinas y que la FSH es la principal hormona responsable. La ultrasonografía proporcionó la evidencia definitiva de que en esta última fase del desarrollo folicular se producen en forma de ondas a lo largo de todo el ciclo estral.

El folículo antral de entre 4 y 9 mm de diámetro es dependiente de la FSH para el crecimiento y cada onda folicular se precede por una elevación en las concentraciones plasmáticas de FSH cuando el folículo dominante tiene un diámetro de 4 mm (Bergfeld et al., 1996). El ascenso de la concentración de la FSH ocurre dentro del primer y segundo día post-ovulación, al momento se elevan las gonadotrofinas, cuando los niveles de LH y estradiol permanecen bajos y esto se asocia con la emergencia de una nueva onda folicular (Ko et al., 1991; Adams et al, 1992; Mapletoft & Pierson, 1993; Mihm & Bleach, 2003). Con las concentraciones crecientes de FSH al día 2 a 4 del ciclo se produce la selección del folículo dominante que seguirá creciendo. El estradiol se produce por las células de la granulosa de los folículos ováricos como resultado de la aromatización de los andrógenos producidos por las células de la teca. Los folículos dominantes tienen concentraciones de estradiol intrafolicular más elevadas que los folículos subordinados. Esta apreciación reforzó el concepto de que la producción de estradiol es uno de los rasgos definitorios de la dominancia folicular. El estradiol producido por el folículo dominante en vías de desarrollo está envuelto en la regulación del feedback negativo de la FSH. La trascendencia de la regulación autócrina y/o parácrina dentro del folículo dominante confiere la habilidad para



**Figura 1 – (a)** Divergencia folicular del folículo dominante frente a los subordinados de mayor tamaño normalizados al día de la emergencia desde un diámetro de 4 mm. **(b)** Concentraciones de FSH asociadas a la desviación folicular del folículo dominante y los subordinados acorde al diámetro folicular. Las tasas de crecimiento antes de la desviación no difieren significativamente. Las concentraciones de FSH alcanzan su nadir el día de la desviación. **(c)** Perfiles de crecimiento de folículo para un ciclo de tres ondas. Las flechas señalan los días de desviación.

Todos los datos publicados por Adams et al., 1992 y Bodensteiner, et al., 1996b.

Adaptado de Ginther et al., 1996

sobrevivir el declive en las concentraciones de FSH y producir el desarrollo de receptores de LH en las células de la granulosa y la producción de estradiol. Está bien demostrado que el mecanismo de FSH es dependiente de la LH y la concentración de esta última determinará el destino del folículo dominante (con concentraciones elevadas durante la fase folicular llevará a la ovulación mientras que con concentraciones bajas durante la fase luteal producirá la regresión y atresia) (Evans & Canty, 2004b).

El descenso en las concentraciones de FSH ocurre cuando el futuro folículo dominante y sus compañeros más grandes tienen un diámetro de 6 mm aproximadamente (Ginther et al., 1996a). La aromatasa está presente ya en folículos de 4 mm (Mc Natty et al., 1984) y bajos niveles de estrógenos se presentan en folículos de 5-7 mm (Echternkamp et al., 1994; Bodensteiner et al. 1996a). Altos niveles de estrógenos exógenos pueden suprimir la secreción de FSH circulantes (Bolt et al., 1990; Bo et al., 1993), lo cual explica la respuesta obtenida con los tratamientos combinados con progestágenos/progesterona combinados con estrógenos en el control del ciclo estral a través de la supresión de la onda folicular en curso y la nueva emergencia 4 a 5 días posterior.

El mecanismo de dominancia no ha sido totalmente determinado y se hipotetiza que éste está asociado con un efecto inhibitorio parácrino del folículo dominante sobre los folículos subordinados del mismo grupo en desarrollo. Mecanismos de esta suerte no podrían ser involucrados como único factor en las especies monoovulares como el bovino, donde el folículo dominante está presente en un ovario y se produce inhibición de los folículos subordinados del ovario contra lateral. Es por consiguiente más aceptado que la dominancia se produce por medio de algún factor que tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotrofinas. Entre los candidatos se encuentra la inhibina, que es producida primariamente por las células de la granulosa y reduce directamente la secreción hipofisaria de FSH. Un segundo candidato, la folistatina, proteína que tiene alta afinidad de unión con la activina, proteína esta última que eleva la secreción de FSH. Por su unión a la activina, la folistatina reduce la secreción de FSH. El desarrollo del folículo dominante hasta las dimensiones preovulatorias depende estrictamente de las gonadotrofinas. Los folículos antrales adquieren los receptores para LH en la teca y para FSH en la granulosa. Bajo la influencia de la LH las células de la teca sintetizan andrógenos que cruzan la lámina basal al interior del compartimiento de las células de la granulosa. Bajo la influencia de la FSH, estos andrógenos son aromatizados en estrógenos. El cambio clave que asienta durante el desarrollo de la competencia ovulatoria de un folículo es la adquisición de receptores para LH por las células de la granulosa. En los folículos donde esto se ha realizado, la LH actúa induciendo la síntesis de grandes cantidades de estrógenos en sinergismo con la FSH. Este proceso es un autoreforzo en el que los estrógenos inducen la formación de más receptores de LH y ésta y la FSH producen una nueva secreción de estrógenos. Los folículos bovinos que se vuelven dominantes o estrógeno-activos producen mucho más estrógenos que los subordinados y tienen considerablemente mayor número de receptores tanto de LH como de FSH.

Un punto importante, destacado por varios estudios, resalta que todos los folículos son capaces de convertirse en dominantes, en base a tres observaciones diferentes:

- (a) Al iniciar los tratamientos con FSH, se estimula a muchos folículos a lograr el diámetro de folículo dominante (Adams et al., 1993a).
- (b) Un folículo seleccionado al azar de un pool de folículos de 5 mm al comienzo de la onda puede lograr la dominancia por medio de la destrucción de otros folículos de su mismo tamaño (Gibbons et al., 1996).
- (c) Incluso luego de la desviación en los rangos de crecimiento de los 2 folículos más grandes, un folículo subordinado puede permanecer viable por 1 o 2 días y puede asumir la dominancia si el folículo dominante original es destruido (Ko et al., 1991; Adams et al., 1993b).

Producto de un incremento en el número de receptores de FSH, el folículo dominante puede ser capaz de seguir creciendo aún en un medio con bajas concentraciones plasmáticas de FSH, mientras que los folículos subordinados sucumben con estos bajos niveles.

El principio de que el folículo ejerce un efecto negativo sobre las concentraciones de FSH en la circulación cuando éste se aproxima a un diámetro aproximado para ser seleccionado dominante al tiempo de la desviación, puede acompañarse por las siguientes puntualizaciones experimentales:

- (a) La normalización en las concentraciones de FSH al día de la desviación folicular indican que, por término medio, la FSH alcanza niveles basales al día que comienza la desviación (ver Figura 1 - b). Los niveles de FSH permanecen bajos por 3-4 días hasta la próxima ola de FSH (Ginther et al., 1996a).
- (b) Los folículos subordinados son capaces de responder a la FSH cuando el dominante fue removido 3 días postovulación, pero no 5 días (Ko et al 1991).
- (c) La supresión de la FSH en hembras preñadas fue más larga cuando la onda folicular asociada tenía un folículo mayor de 10 mm que cuando tenía el mismo un diámetro entre 6 y 9 mm (Ginther et al., 1996b).

El segundo postulado del mecanismo de desviación es que el folículo seleccionado adquiere LH-dependencia, aseveración apoyada por una serie de estudios, los cuales establecen los siguientes puntos:

- (a) En dos estudios (Xu et al., 1995; Bodensteiner et al., 1996b) se mostró que las células de la granulosa adquieren receptores para LH entre los días 2-4 post-ovulación o post-emergencia de la onda.
- (b) Vacas lactando en BEN (Balance Energético Negativo) (Grimard et al., 1995) tuvieron bajas frecuencias en pulsos de LH y el diámetro folicular más grande fue de 8.7 mm, mucho menores que los hallados en vacas con BEP (Balance Energético Positivo) que alcanzaron diámetros foliculares de 10.2 mm.
- (c) Después del día 90 de preñez disminuye el diámetro máximo de los folículos grandes de sucesivas ondas foliculares (Ginther et al., 1996b), así como disminuye la concentración de LH, los pulsos y frecuencias (Schallenberger et



al., 1985), indicando relación entre el máximo diámetro folicular y la concentración de LH.

Mediante ultrasonografía se puede observar que a los dos días de detectarse una onda, existe un folículo (folículo dominante) que crece más rápidamente que los demás (folículos subordinados). A los 6-7 días del comienzo de la onda el folículo dominante ha alcanzado prácticamente su máximo tamaño (15-17 mm) y los folículos subordinados han sufrido el proceso de atresia. En este momento, el folículo dominante puede ovular o de lo contrario entra en una fase estacionaria que dura aproximadamente otros 6 días y en la que mantiene su tamaño y capacidad ovulatoria. Si entonces no se ha producido la ovulación de este folículo, comienza un proceso de atresia y otros 9 días más tarde su tamaño ya ha descendido por debajo de los 4 mm.

Aunque todos los folículos dominantes son capaces de ovular, su habilidad para ello está dictada por el ambiente hormonal. La progesterona previene la ovulación de folículos dominantes que maduran durante la fase luteal a través de la retroalimentación negativa ejercida por la LH. Los folículos dominantes que se desarrollan bajo estas condiciones retroceden como los folículos subordinados. Una vez que disminuye la concentración de progesterona plasmática, la pulsatilidad de la LH aumenta y, bajo la influencia del estradiol, una ola de gonadotrofinas lleva a la ovulación del folículo dominante.

En un ciclo sexual fisiológico, el factor fundamental que determina el destino del folículo dominante (ovulación o atresia) es el nivel de progesterona cuando este folículo finaliza su fase de crecimiento. De esta manera, cuando los niveles de progesterona son elevados (fase luteínica del ciclo) se produce la regresión del folículo dominante, mientras que en la fase folicular del ciclo, sin el "freno" de la progesterona, el destino del folículo dominante es la ovulación.

A lo largo del ciclo estral, típicamente se producen 2 o 3 ondas de desarrollo folicular. En vaquillonas y durante el posparto temprano de vacas multíparas parecen más frecuentes los ciclos ováricos con 2 ondas, mientras que vacas adultas presentan habitualmente ciclos de 3 ondas. Todavía no existen datos estadísticos suficientes sobre la frecuencia relativa de ciclos de 2 o 3 ondas referidas a cada población bovina o estado productivo de los animales. De todas maneras, esta diferencia viene condicionada por la duración del cuerpo lúteo del ciclo, lógicamente menor en ciclos de 3 ondas que en ciclos de 2 ondas.

También se han detectado ciclos con 4 ondas foliculares y en estos casos la duración del ciclo ha sido de 24 días, ocurriendo la luteólisis en torno al día 20-21 del ciclo. Así, el principal factor que condiciona la duración del ciclo y por lo tanto la existencia de 2 o 3 ondas por ciclo, parece ser la vida del cuerpo lúteo.

En ciclos estrales con 2 ondas de desarrollo folicular, éstas se pueden detectar el día de la ovulación (día 0) y el día 10 post ovulación. Este último folículo es el que ovulará, ya que la regresión del cuerpo lúteo ocurre el día 16-17 del ciclo, mientras que el folículo que comenzó su desarrollo el día 0 normalmente experimentará el proceso

atresico. En ciclos con 3 ondas éstas pueden ser detectadas los días 0, 9 y 16 post ovulación, siendo las dos primeras anovulatorias debido a que la fase luteal se mantiene en estos casos hasta el día 19 del ciclo.

Esta dinámica folicular se mantiene al menos durante los 2-3 primeros meses de gestación, habiéndose observado en vacas gestantes la presencia de ondas periódicas que surgen cada 9-10 días. Lógicamente, estos folículos nunca llegan a ovular debido al efecto inhibitor de la progesterona producida por el cuerpo lúteo gestacional.

De cualquier manera, ha quedado demostrado que los folículos dominantes de cualquier onda del ciclo son capaces de ovular, y lo que es igualmente importante, que la fertilidad subsiguiente a la ovulación de cualquiera de estos folículos es muy similar.

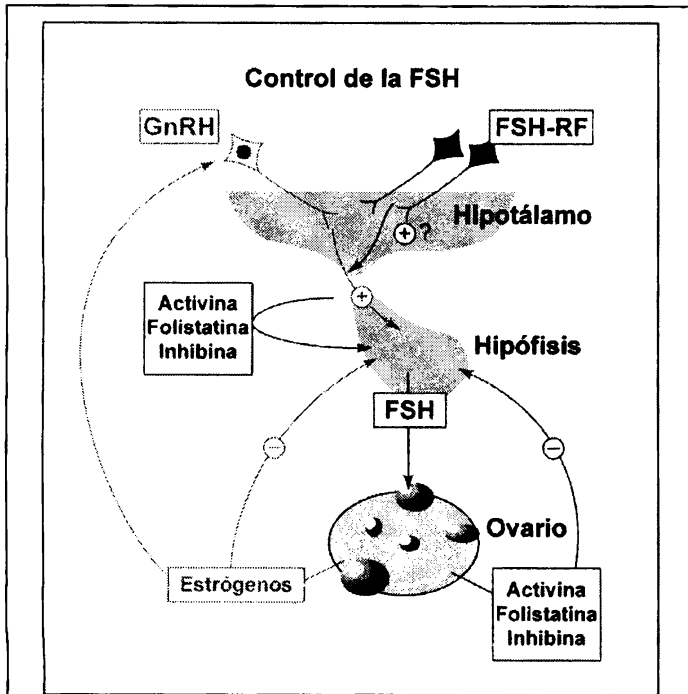
#### **4.1.2) Las inhibinas, activinas y folistatina**

La respuesta diferencial del ambiente hormonal producido por la FSH puede ser fundamental para la selección del folículo dominante y la regresión de los folículos secundarios. Numerosos péptidos actuando como factores de crecimiento, incluso del miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento de tipo transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el sistema IGF están envueltos en el desarrollo folicular. La superfamilia TGF- $\beta$  de señales extracelulares comprende más de 30 estructuras relacionadas a proteínas funcionalmente diversas que incluyen dos inhibinas (A y B), tres activinas (A, B y AB) y la folistatina (Knight & Glistler, 2003).

Las inhibinas ejercen una acción supresora de la FSH a nivel pituitario (ver Figura 2) siendo glicoproteínas diméricas que consisten en dos sub-unidades A y B con pesos moleculares que varían entre 29 y más de 160 kDa (Good et al, 1995). Las concentraciones foliculares de inhibina A están positivamente relacionadas con el tamaño del folículo antral. Recíprocamente, las concentraciones de inhibina B disminuyen con el tamaño del folículo creciente. Sin embargo, los niveles de inhibina B intrafolicular son más bajos que los de inhibina A en el folículo en desarrollo, cuestionando de esta manera la relevancia fisiológica de la inhibina B en la hembra bovina (Knight & Glistler, 2003). Todas las formas diméricas de inhibina producen efecto supresivo sobre la síntesis de FSH así como su liberación sistémica (Good et al, 1995). Las inhibinas también tienen un rol local a nivel folicular suprimiendo la síntesis de estradiol y oponiéndose a la acción de las activinas, vedando el crecimiento folicular y la diferenciación celular.

Estudios de desarrollo folicular in vivo han producido el cese del crecimiento folicular por el descenso en los niveles de FSH provocados por la administración de fluido folicular (Kastelic et al., 1990). Los componentes proteínicos del líquido folicular, entre los que se incluyen la inhibina, contribuyen a este efecto (Kastelic et al., 1990; Turzillo & Fortune, 1993). El antisuero de inhibina aumentó los niveles de FSH en la circulación (Kaneko et al., 1995).

El folículo dominante puede secretar otros factores que directamente inhiben los demás folículos o destruyen los efectos estimulatorios de la FSH sobre el desarrollo de



**Figura 2** – Representación esquemática de la regulación neuroendocrina de la FSH. Se observa al hipotálamo, hormonas ováricas y pituitarias involucradas en la regulación de la producción y secreción de FSH. A nivel hipotalámico la GnRH es el estimulador conocido de la descarga de FSH. Hay evidencia de la existencia de un factor liberador de FSH (FSH-RF). A nivel pituitario, están involucradas la activina, inhibina y folistatina que parece ser operacional. A nivel ovárico el estradiol y la inhibina son dos elementos inhibidores de la descarga de FSH.

Modificado de Padmanabhan & McNeilly, 2001

foliculos más grandes y con una disminución reciproca o ningún cambio en la folistatina (Austin et al, 2001; Knight & Glister, 2003). Los aumentos en la activina A y la desviación folicular están asociados en principio con aumentos en la IGF-I intrafolicular y estradiol (Ginther et al, 2003). La activina refuerza la síntesis de la inhibina en las células de la granulosa. La misma se postula con un rol fundamental en la sensibilización del folículo a la FSH a través de la inducción de receptores específicos y en la promoción y mantenimiento del estado de foliculogénesis del folículo. La inducción de receptores de FSH en folículos indiferenciados que se definen como gonadotrófico-independientes, puede ser un método de reclutamiento-selectividad de folículos a partir del pool primario, proponiéndose un rol regulador de la activina en la respuesta y desarrollo folicular.

La folistatina está conformada por unidades glicosiladas, ricas en polipéptidos de cistina y producto de las células de la granulosa. La folistatina neutraliza las acciones de

foliculos subordinados. Esta posibilidad está basada en la inhibición del crecimiento folicular por la inyección de fluido folicular sin alterar la concentración de FSH en la circulación; cuando el fluido estaba libre de inhibina (Law et al., 1992) o con antisuero contra inhibina (Wood et al., 1993). La inyección con la fracción proteínica del fluido folicular 3-6 días luego de la ovulación no deprimió la concentración de FSH por debajo de los niveles basales (Adams et al., 1992), pero previno el crecimiento del folículo dominante más allá de 10 mm comparados con los controles de 14 mm (Kastelic et al., 1990).

Las activinas son homodímeros de la sub-unidad inhibina  $\beta$  y se oponen a la acción de las inhibinas a nivel central (hipófisis) y ovárico compitiendo por los receptores tipo II de activina (ver Figura 2). Sin embargo, la función de las activinas está regulada por los niveles de folistatina la que neutraliza su función. El crecimiento folicular está asociado con el aumento en los niveles de activina A en

la activina a nivel central y periférico, ésta también despliega la acción de la inhibina aunque en menor grado, mediante la disminución del contenido de FSH en las células de la pituitaria (Knight & Glister, 2003).

Padmanabhan & McNeilly (2001), al desarrollar un modelo de secreción de FSH, introducen la respuesta causada por cambios locales. Además del papel muy bien estudiado de la GnRH sobre la liberación de FSH, varios otros factores han sido implicados en los mecanismos de biosíntesis y descarga de FSH a la circulación. Los esteroides gonadales y varios otros factores: proteínas reguladoras, incluso la inhibina, folistatina y activina (Mather et al., 1992), está última más potente que la GnRH en la regulación de la FSH $\beta$  ARNm., tienen su rol en la regulación de la FSH. El estradiol y la inhibina se presentan como factores inhibitorios primarios. Estudios indican que las activinas, inhibinas y la folistatina no sólo se producen a nivel gonadal sino también pituitario y por consiguiente, tendrían un potencial modulador local para la secreción de FSH (ver Figura 2).

#### **4.1.3) Regulación subcelular (molecular) del desarrollo folicular**

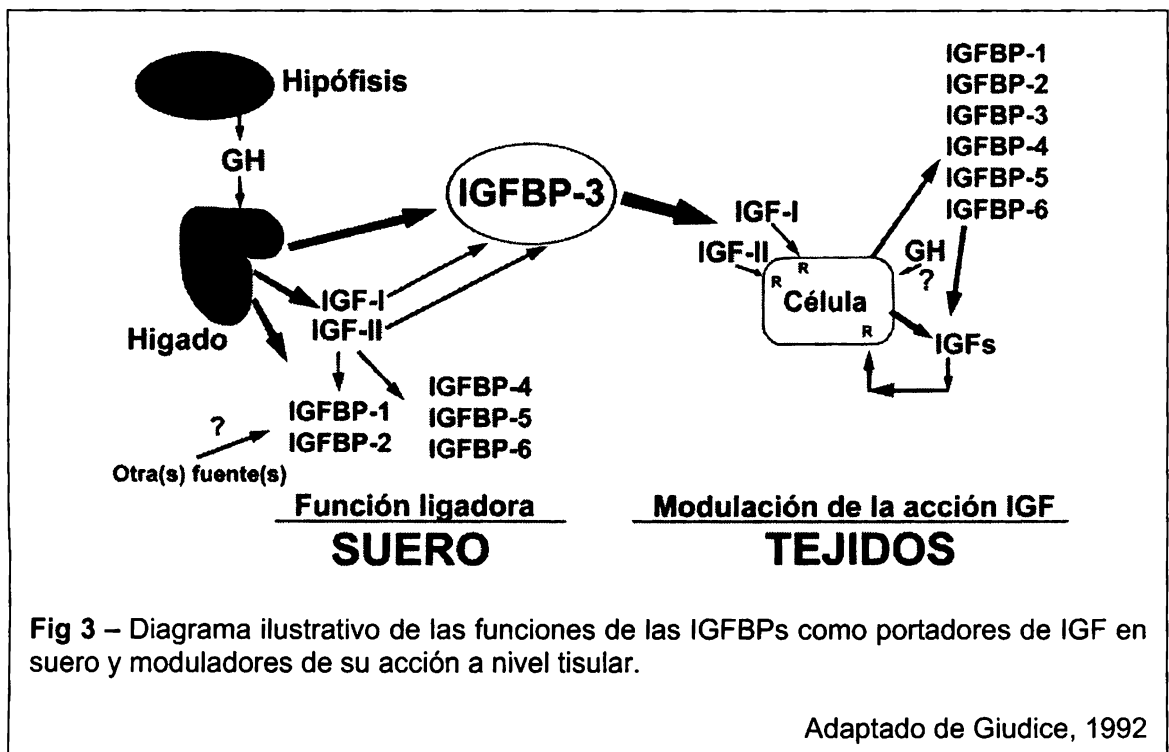
La muerte celular dentro de los folículos se realiza vía apoptosis (muerte celular programada). La apoptosis es el último mecanismo de una serie de caminos que descartan las células no deseadas del organismo. Este proceso es regulado por numerosos factores intra y extra celulares (por ejemplo: factores de crecimiento, gonadotrofinas, etc. en las células del folículo) El genoma bovino codifica para unos 30 a 40 mil genes y el modelo de expresión genética en células ováricas que controlan estas vías y el desarrollo del folículo están estudiándose en la actualidad. Estos genes codifican para muchos factores incluso las citocinas, receptores, señales moleculares para la trasducción, transcripción y otros factores de crecimiento, enzimas, reguladores del ciclo celular, componentes celulares y factores que involucran la apoptosis. En la interacción de estas moléculas es que se obtiene el futuro celular, proliferación o muerte. Varios estudios recientes han comenzado a examinar esta multitud de sendas que nos ayudarán a comprender la regulación molecular de desarrollo folicular (Johnson, 2003; Sisco et al, 2003; Evans et al, 2004a; Fayad et al, 2004).

#### **4.1.4) El Sistema IGF**

IGF-I y su homólogo IGF-II son péptidos de bajo peso molecular que promueven la mitosis y diferenciación celular en una variedad de sistemas (Ong et al., 1987; Merriman et al., 1990) y se cree que juegan un rol importante a nivel del desarrollo folicular. En 1978, la IGF-I e IGF-II fueron aisladas y secuenciadas por Rinderknecht & Humbel y desde ese momento, se ha acumulado gran información con respecto a dichos péptidos, así como sus receptores y proteínas ligadoras (IGFBPs), conformando el llamado "sistema autócrino/parácrino IGF" (Giudice, 1992).

El control endocrino involucra complejas interacciones de varias hormonas y factores de crecimiento, actuando de manera endocrina, parácrina y/o autócrina. En el eje somatotrófico actúan a nivel pituitario la hormona del crecimiento (GH o somatotrofina), sus receptores (GHR), los factores de crecimiento insulinosimiles

(IGFs), sus proteínas ligadoras (IGFBP) y los receptores de IGF-I (IGF-IR), que juegan un papel esencial en la regulación de crecimiento postnatal, sobre todo en la utilización de los nutrientes (Di Mauro et al. 2002) (ver Figura 3).



**Fig 3** – Diagrama ilustrativo de las funciones de las IGFBPs como portadores de IGF en suero y moduladores de su acción a nivel tisular.

Adaptado de Giudice, 1992

Estudios recientes indican que los IGFs y especialmente el IGF-I potencializa el desarrollo del folículo, pero no se han establecido diferencias claras en las concentraciones de IGF-I entre los folículos dominantes y subordinados. Sin embargo existe regulación múltiple de la actividad de IGF mediante proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) que fijan y secuestran a la misma y se ha demostrado que existe mayor concentración de IGFBP en los folículos subordinados que en el dominante. Este hallazgo es consistente con la hipótesis que plantea que los folículos dominantes pueden emplear de manera más efectiva los niveles existentes de FSH debido al aumento de disponibilidad de los IGF y que la atresia de los folículos subordinados es producto de una reducción inducida por las IGFBP sobre los niveles de IGF.

In vitro, los IGFs estimulan un amplio rango de acciones insulínicas, incluyendo acción mitogénica así como efectos metabólicos (Daughaday & Rotwein, 1989; Rechler & Nissley, 1990). A pesar de su similar estructura y acciones "in vitro", IGF-I e IGF-II tienen diferentes acciones "in vivo". IGF-I, también conocida como somatomedina C, es GH-dependiente, y como su nombre lo implica, se cree que media las acciones de crecimiento que promueve la GH. El hígado es la principal fuente de IGF-I, cuya síntesis es regulada por la GH (Roberts et al., 1986; Hynes et al., 1987). También es sintetizado por otros tejidos, donde su producción es también regulada por la GH así como otros moduladores y producida independiente de la GH en tejidos de especies experimentales (Murphy et al., 1987; Murphy & Friesen, 1988). La IGF-II también es

sintetizada en varios tejidos, pero éste es minimamente dependiente de la GH (Daughaday & Rotwein, 1989; Rechler & Nissley, 1990). Se cree que cumple un rol importante en el crecimiento y desarrollo fetal y cuando aumenta su concentración a nivel del SNC tendría un rol importante en el desarrollo del mismo.

El sistema IGF ovárico bovino comprende el IGF-I y el IGF-II, el receptor IGF tipo I, cuatro diferentes proteínas ligadoras (IGFBPs) y las recientemente descubiertas proteasas contra IGFBPs (Rivera & Fortune, 2003). Los IGFs estimulan la proliferación de las células de la granulosa (Adashi et al., 1985), esteroidogénesis (Spicer et al., 1993; Spicer & Echternkamp, 1995; Armstrong et al., 1996) e inhiben y activan la síntesis de la FSH de manera dependiente (Glister et al., 2001). En forma resaltante, las concentraciones intrafoliculares de IGF permanecen inalteradas durante el desarrollo folicular pero el mismo está asociado con las variaciones en las concentraciones intrafoliculares de IGFBP. Los IGFBPs se ligan a los IGFs previniendo la interacción con los receptores de IGF (Mohan et al., 1989; Blat et al., 1989; Perkel et al., 1990) posiblemente mediante el secuestro extracelular de IGF y por lo tanto limitando el acceso del péptido a los receptores específicos. La actividad estrogénica del folículo está correlacionada negativamente con las concentraciones intrafoliculares de IGFBPs de bajo peso molecular (IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-5). Existe un sinergismo entre los estrógenos y la IGF-I para aumentar la biosíntesis de progesterona por las células de la granulosa, estos agentes actuando sinérgicamente aumentan la unión de los receptores IGF-I, sin cambiar la afinidad del receptor (Giudice, 1992). A su vez, los niveles de IGF-I a nivel del líquido folicular aumentan correlativamente con las concentraciones de estrógenos (Spicer et al., 1988; Echternkamp et al., 1990; Spicer & Enright, 1991; Spicer et al., 1993, Echternkamp et al., 1994). La IGF-II es expresada exclusivamente en la teca, con alta expresión en los folículos dominantes (Yuan et al., 1998).

Las concentraciones reducidas de IGFBPs y los niveles más altos en la bioactividad de IGFs pueden ser considerados esenciales para la selección folicular, permitiendo al folículo dominante resistir la declinación en las concentraciones de FSH sin sufrir apoptosis. Las concentraciones intrafoliculares de IGFBPs se regulan a nivel de la expresión del gen que codifica para tales proteínas a nivel primario y posteriormente vía proteólisis a nivel de proteasas de IGFBP en el fluido folicular. Elevando el nivel de proteasas de IGFBP se ha logrado la supervivencia de la dominancia en comparación con los folículos subordinados (Fortune et al., 2001).

Un mínimo de factores han sido identificados en la regulación de los niveles séricos de IGFBPs, incluyendo el estatus nutricional, hormonal, proteasas y la edad. Los niveles circulantes de IGFBPs son inversamente proporcionales a los niveles de insulina en suero (Holly et al., 1988; Suikkari et al., 1988; Suikkari et al., 1989; Singh et al., 1990; Pao et al., 1993; Lee et al., 1993; Orskov et al., 1994; Brismar et al., 1994; Lee et al., 1997), inhibiendo asimismo su producción por las células de la granulosa, actuando a través de su propio receptor (Orskov et al., 1994). La insulina también afecta la expresión de los receptores ováricos de IGF-I.

Las funciones de las IGFs son resumidas por Poretsky et al. (1999) de la siguiente manera:

- 1) Transporte de IGFs por la circulación.
- 2) Control de la emanación de IGFs en el espacio vascular.
- 3) Prolongar la vida media de los IGFs.
- 4) Prevenir las hipoglucemias ocasionadas por los IGFs.
- 5) Modular las interacciones de los IGFs con sus receptores en los tejidos blancos.

Aunque el control primario de la secreción de gonadotrofinas es mediante la GnRH secretada por el hipotálamo y la función/actividad gonadal es controlada por las gonadotrofinas y la prolactina, se evidencia un rol vital de la somatotrofina y del factor de crecimiento insulino-simil tipo I (IGF-I) en el control de la función de la pituitaria y las gónadas. Se ha demostrado que la deficiencia de la GH, resistencia a la GH y alteraciones experimentales en la secreción de IGF-I modifican la foliculogénesis, maduración de los ovarios, ovulación y preñez; en el macho, la IGF-I y la GH juegan un rol importante en la espermatogénesis y en la función de las células de Leydig. Cierta número de estudios han revelado que la fertilidad es afectada por deficiencia de GH en casos de enanismo y de ablación del gen que codifica para IGF-I en los ratones, posiblemente debido al funcionamiento subnormal de la glándula pituitaria y de las gónadas. En las hembras ratonas, al anular la expresión del gen que codifica para los receptores de la GH (GHR-KO), ocurrió un deterioro en el desarrollo folicular, ovulación, maduración sexual, producción y sensibilidad de las señales de las feromonas y la función del CL. La deficiencia de la IGF-I en los ratones machos GHR-KO, ocasiona que la pubertad se vea retardada, afectada la espermatogénesis y además atenuada la función del eje neuroendócrino-gonadal. Similarmente en algunos pacientes humanos que sufren del Síndrome de Laron que provoca insensibilidad o resistencia a la GH o deficiencia de GH, la pubertad está retardada debido a la resistencia a la GH. Estos datos sugieren que en adición a la GnRH y gonadotrofinas, la GH/IGF-I influyen las funciones de la pituitaria y gónadas en animales y humanos (Chandrashekar et al., 2004).

Se analiza por tanto que, la GH y el IGF-I, importante mediador de las funciones de la GH, ejercen efectos directos e indirectos en cada órgano del cuerpo. La GH participa directamente en el control de la maduración sexual y la habilidad de esta hormona para estimular varios aspectos de la función gonadal en animales hipofisectomizados se conocen desde hace años. Estudios en ratones con deficiencia de GH, hipopituitarismo o disfunción en la decodificación de genes para el receptor de GH, y/o receptores de IGF-I demuestran que las señales de IGF-I son absolutamente requeridos para el desarrollo sexual, mientras que la ausencia de señales de GH generalmente no evita la fertilidad del macho o de la hembra. La implicancia de estos descubrimientos es que la biosíntesis de la IGF-I independiente de la secreción de GH por la pituitaria es suficiente para alcanzar la pubertad y para el funcionamiento del sistema reproductivo. Sin embargo, madurar a edad normal y alcanzar el potencial reproductivo total requiere acciones de la GH y niveles adecuados de IGF-I en la circulación periférica (Chandrashekar et al., 2004).

Es considerable la evidencia de que la GH tanto a nivel de producción local como sistémica puede ejercer estimulación, sinergismo o contra efectos inhibitorios en cada nivel del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (HPG), en el tracto reproductivo, genitales externos y glándula mamaria. Sin embargo, datos obtenidos en animales transgénicos indican que una elevación crónica de GH y de IGF-I por encima del rango normal, puede interferir con muchos aspectos relacionados a la reproducción (Chandrashekar et al., 2004).

## **4.2) TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS EN EL GANADO VACUNO**

Los objetivos de un programa de superovulación están dados por la obtención de un gran número de ovocitos y la mayor cifra de embriones viables y transferibles, con lo cual obtener altas tasas de preñez en los animales receptores. Sin embargo, la variabilidad individual y la escasa repetibilidad han llevado a que los logros investigativos en la fisiología reproductiva no se plasmen en los programas a nivel comercial.

En un trabajo de Looney (1986) en el cual se evaluó la respuesta de 2,048 colecciones de embriones de donantes bovinas, se obtuvo una media de 11.5 estructuras/animal y de ellas 6.2 embriones viables y transferibles por vaca. Lo más destacable del trabajo fue la variabilidad en la respuesta al tratamiento con un 25 % de colecciones inviábiles, 64% de donantes que produjeron menos embriones viables que el promedio y finalmente, un 30% de colecciones de donde se obtuvieron el 70% de las estructuras transferibles. Estudios posteriores han ratificado esta inconsecuencia en la respuesta a los tratamientos (Hahn, 1992).

Tradicionalmente, los programas de superovulación en el ganado vacuno comenzaban empíricamente durante la fase luteal media, preferentemente entre los días 8 y 12 del ciclo (considerando como día 0 la demostración del celo). Esto derivó en múltiples ensayos durante la década de los 80 que demostraron que tratamientos superestimulatorios comenzados entre los días 9 y 10 después de detectado el celo, resultaban en una mejor respuesta que aquellos iniciados antes (entre los días 2 y 6) o después (entre 12 y 13 días post-celo; Lindsell et al. 1986a). Esto demostró que el conocimiento de la fisiología y endocrinología de las ondas de desarrollo folicular y su regulación tenían gran trascendencia práctica y nos permitían predecir de una manera bastante exacta la respuesta de los animales a los diferentes métodos de control hormonal del ciclo (Bo & Mapletoft, 2003). Así por ejemplo, la respuesta superovulatoria de vacas tratadas con FSH o PMSG en transferencia de embriones, está supeditada a la fase de desarrollo folicular en que se inicia el tratamiento de superovulación (Kanitz et al., 2002). Los tratamientos tempranos conducen a respuestas muy pobres en lo que refiere a número de ovulaciones, debido a que el proceso de atresia de los folículos subordinados de esa onda ya está avanzado y no es posible "rescatar" ya muchos de esos folículos. Por el contrario, tratamientos superovulatorios comenzados simultáneamente con el inicio de una onda de desarrollo folicular, conseguirán reclutar o rescatar de la atresia mayor número de folículos. Es por ello que empíricamente se alcanzaron los protocolos convencionales de superestimulación entre los días 8 y 12 del



ciclo, protocolos que fueron posteriormente validados (Gonzalez et al. 1994; Mapletoft, 2000).

#### **4.2.1) Factores que Afectan la Respuesta Superovulatoria**

La respuesta superovulatoria y la producción de embriones viables por vaca donante es el resultado de un gran número de factores. Éstos pueden ser divididos en los relacionados al tratamiento superovulatorio y aquellos relacionados con factores individuales y fisiológicos del animal (Bo & Mapletoft, 2003).

La variabilidad de las donantes a los tratamientos superovulatorios con gonadotrofinas continúa siendo uno de los mayores problemas en programas comerciales de transferencia de embriones (Mapletoft et al., 2002; Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004). Mapletoft et al. (2002) discuten esta variabilidad en la respuesta superovulatoria y en la calidad de los embriones obtenidos. Otros autores además, agregan que, el número de embriones colectados en el ganado de razas cárnicas supera a las razas lecheras en la media obtenida. En un trabajo reciente en ganado Holando de alta producción se verificó la importancia de la variabilidad individual (Martins et al., 2005).

Dentro de los factores relacionados al tratamiento de superestimulación ovulatoria pueden destacarse aquellos vinculados a las gonadotrofinas utilizadas (Kanitz et al., 2002) y los protocolos empleados (momento de inicio del tratamiento, dosis total y dosificaciones, lote del producto, etc), la vía de administración empleada, el efecto raza y ambiente, y la inducción o control de la ovulación. No debe dejarse de lado otros aspectos por más importante que aportan a la variabilidad como son el status nutricional, la edad de los animales, la historia reproductiva de los mismos, la estación del año y la condición ovárica al momento del inicio de los tratamientos hormonales (Kawamata, 1994; Yaakub et al., 1999; Mapletoft et al., 2002).

##### **4.2.1.1) Tipos de Gonadotrofinas Empleadas**

En los protocolos de superovulación se han empleado tres distintas gonadotrofinas sobre el ganado donante: las gonadotrofinas de extractos hipofisarios de animales domésticos, la gonadotrofina coriónica equina (eCG o PMSG) y la gonadotrofina menopáusica humana (hMG). Las primeras son las más utilizadas actualmente y en su empleo surge la dificultad de la contaminación de los compuestos con grados variables de LH, lo cual depende del producto y más precisamente del lote empleado (Murphy et al., 1984; Lindsell et al., 1986b; Kanitz et al., 2002). La vida media de la FSH es de 5 hrs (Laster, 1972) por lo cual se deben administrar cada 12 hrs por vía intramuscular. Generalmente, los tratamientos consisten en dosis constantes o decrecientes durante 4 a 5 días (Chupin et al., 1984; González et al., 1990). Se administra asimismo PGF $2\alpha$  a las 48 hrs (en tratamientos de 4 días) o a las 72 hrs (en tratamientos de 5 días) de haber iniciado el tratamiento, sin notarse diferencias significativas en las respuestas (Bo & Mapletoft, 2003).

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una glicoproteína compleja que presenta tanto actividad FSH como LH. Su vida media es de 40 hrs en el bovino y se detecta en la circulación por lo menos durante 10 días (Murphy & Martinuk, 1991). Por esta farmacocinética es que se administra generalmente en una única dosis por vía intramuscular seguida de PGF2 $\alpha$  48 hrs después. La permanente estimulación ovárica ocasionada por la prolongada vida media de la hormona, trae aparejado problemas reproductivos varios, como folículos que no ovulan y perfiles endocrinos anormales con altos niveles de estrógenos y los embriones obtenidos son en general, de mala calidad (Saumande, 1980; Mikel-Jenson et al 1982; Moor et al., 1984). En gran medida, estos problemas se contrarrestan con la administración de un anti-suero eCG o anticuerpos monoclonales contra dicha hormona administrados al momento de la primera IA (Dieleman et al., 1987; 1993; González et al, 1994a y b). Las dosis recomendadas oscilan entre las 1500 a 3000 UI, administrándose generalmente 2500 UI en forma intramuscular.

La gonadotropina menopáusica humana (hMG) no se emplea habitualmente en la práctica veterinaria por su elevado costo. Su acción es 50% FSH y 50% LH y los protocolos que la emplean consisten en aplicaciones cada 12 hrs a dosis decrecientes durante 4 a 5 días (McGowan et al., 1985).

Existen divergencias de preferencias entre los investigadores por los tratamientos que utilizan extractos pituitarios versus aquellos que emplean eCG y los resultados obtenidos con tales hormonas. Ciertos autores (Elsden et al., 1978; Monniaux et al., 1983) comunican mejores resultados en las respuestas obtenidas a través de los embriones colectados con tratamientos con FSH-P frente a eCG, aunque otros (Critser et al., 1980; Mapletoft et al., 1990) no encontraron diferencias entre ambas hormonas.

A pesar de que la foliculogénesis requiere de la acción de la FSH y la LH, los extractos hipofisarios contienen diferentes proporciones de actividad de tales hormonas, lo que afecta las respuestas obtenidas (Mapletoft et al., 1991; Kanitz et al., 2002). También en la actividad de la eCG existe variabilidad en la relación FSH/LH, no sólo entre yeguas preñadas, sino también en sueros obtenidos de una misma yegua en distintos momentos de la gestación (Murphy & Martinuk, 1991). Por esta razón, los productos a utilizar deben proveer la titulación por lote producido en relación a los niveles de FSH y LH.

Dentro de los extractos pituitarios, aquellos con menor actividad LH tendrían, una mejor respuesta superovulatoria en el bovino. Chupin et al. (1984) estimularon tres grupos de vacas lecheras con cantidades equivalentes de FSH porcina pura, variando en el ensayo la cantidad de LH agregada a cada grupo, se analizó el número de embriones recuperados y transferibles y se halló que estos estaban en relación inversa a la actividad LH del compuesto utilizado. Ensayos similares, como el realizado por Willmott et al. (1990) sobre razas carnicas, emplearon compuestos con un extracto pituitario de 400 mg NIH-FSH-P1 de FSH y distintas cantidades de LH (100, 32, 16 y 2%) y demostraron que la respuesta, medida a través de los CLs palpables y embriones obtenidos fue claramente diferente entre los animales tratados con altas cargas de LH (100% y 32%) y aquellos con bajas cantidades de la hormona (16% y 2%).

En el mismo experimento se demostró que el extracto porcino sin purificar induce una respuesta superovulatoria significativamente menor a la producida por los extractos a los que se les había extraído el 84% y 98% respectivamente, con lo que se concluyó que, la contaminación con LH puede afectar la respuesta superovulatoria en el ganado, siendo el máximo nivel aceptable de actividad LH de un 15% a un 20%.

Generalmente se piensa que cierta actividad LH es necesaria para lograr superovulación. No obstante se ha sugerido que, debido a la prematura activación del ovocito previo a la ovulación (Moor et al., 1984), los niveles de LH elevados durante la superestimulación afectan la calidad de los embriones (Bo & Mapletoft, 2003). Algunos trabajos han logrado inducir una muy alta respuesta con FSH recombinante, obteniendo porcentajes de fertilización superiores al 95% y de embriones viables por encima del 85% (Looney et al., 1988; Wilson et al., 1989). Con estos resultados podría interpretarse que la administración de LH, en cualquier dosis, tiene un efecto negativo sobre la calidad de los embriones.

#### **4.2.1.2) Vías de Administración**

Dentro de los protocolos tradicionales de dos aplicaciones diarias de extractos pituitarios se han observado diferencias marcadas en la respuesta a favor de la administración intramuscular (i.m.) en relación a las inyecciones subcutáneas (Bo et al., 1991a). La administración subcutánea produjo niveles circulantes mucho más bajos de FSH, que se mantuvieron por períodos más largos de tiempo.

En base a la lenta liberación del principio activo en la administración vía subcutánea, se han analizado protocolos alternativos, con la finalidad de evitar la administración de la hormona cada 12 horas, una práctica muy tediosa pero igual de importante para los resultados del tratamiento. En un ensayo de Bo et al. (1994a), se administró una sola inyección de 400 mg de NIH-FSH-P1 de Folltropin-V® (González et al., 1990) por vía subcutánea en la zona posterior de la escápula que resultó en una respuesta equivalente a la de un tratamiento tradicional con dos dosis diarias durante 4 días. El éxito del tratamiento con una única inyección depende de que la absorción de la FSH en el sitio de inyección sea paulatina. Por lo tanto, el lugar y la vía de administración del principio activo afectan dramáticamente los resultados. En el mismo ensayo se observó que los tratamientos de una sola inyección por vía intramuscular o subcutánea en la tabla del cuello resultaban en respuestas menores a aquellas producidas por la administración subcutánea detrás de la escápula. El mismo tratamiento no resultó en respuestas eficaces cuando se inyectaron dosis menores a 400 mg NIH-FSH-P1 en vacas de carne, probablemente debido a que no alcanzaron en sangre la concentración límite de 1 ng/mL, necesaria para la estimulación del crecimiento folicular (Bo & Caccia, 2002). Con este tratamiento tampoco se encontraron respuestas aceptables en ganado Holando (Hockley et al., 1992), probablemente debido a la escasa grasa subcutánea de esta raza, que favorece la absorción de la hormona y resulta en la reducción de la respuesta superovulatoria. La alternativa es interesante en esquemas donde el manejo tradicional no es posible o resulta en importantes factores estresantes sobre los animales que ocasiona bajas respuestas al

tratamiento, pero debe ser realizado por personal capacitado y en ciertas condiciones (Bo & Mapletoft., 2003).

#### **4.2.1.3) Efecto raza y ambiente sobre la respuesta superovulatoria**

La variabilidad individual es un factor muy importante que afecta los resultados de los tratamientos. Las distintas razas responden de forma un tanto diferente a las hormonas, mostrando diferente sensibilidad a las mismas y a su concentración. En este sentido Chupin et al. (1985) sugirieron que las vacas Holando requieren una proporción mayor de actividad FSH en los compuestos que aquella necesitada por las razas continentales como la Charolais, donde la actividad LH jugaba un rol importante en la respuesta superovulatoria.

Se han reportado también respuestas mayores con tratamientos de extractos pituitarios purificados frente a aquellos contaminados con actividad LH en ambientes de estrés calórico (Page et al., 1989), diferencia no observada en ambientes de temperaturas moderadas. Estos ensayos se realizaron con ganado Holando en Florida, EE.UU. En Argentina, Tríbulo et al. (1991) obtuvieron resultados opuestos hallando, en ganado índico, una mejor respuesta de los animales a preparados menos purificados en verano que en invierno. La explicación podría hallarse en que para el ganado *Bos indicus* las temperaturas de invierno conforman un factor estresante. Por lo tanto, en condiciones de estrés climático las vacas responden mejor a los extractos más purificados.

También se han hallado diferencias en relación a las dosis utilizadas en las distintas razas. Trabajos de González et al., (1990) indican que una dosis de 400 mg de NIH-FSH-P1 es ideal para ganado *Bos taurus*. Actualmente se considera que esta dosis es óptima para ganado Holando adulto y en lactancia, pero trabajos de campo, con ganado de carne, indican que con dosis de 260 a 320 mg en vacas y 200 a 260 mg en vaquillonas, se obtienen respuestas satisfactorias. El ganado *Bos indicus* responde de manera exagerada a las altas concentraciones de FSH y en vacas Nelore se han encontrado respuestas satisfactorias con dosis de 133 a 200 mg de NIH-FSH-P1 y dosis de 200 a 260 mg en razas sintéticas como Brangus y Braford (Nasser et al., 2003). Las diferencias raciales se han demostrado para todos los preparados comerciales en plaza, recomendándose a nivel de la etiqueta la dosis según raza y condición fisiológica de los animales.

#### **4.2.1.4) Inducción de la ovulación**

En las vacas superovuladas, el intervalo desde la administración de PGF2 $\alpha$  hasta el pico de LH varía en un rango de 38 a 42 hrs (Callesen et al., 1986). Se ha observado que los perfiles anormales de LH en suero incluyendo ausencia del pico de LH, pico muy bajo, prematuro o demorado, resultan en bajas tasas de ovulación y fertilización (Greve et al., 1983; 1984; Callesen et al., 1986). Por esto último el tratamiento de inducción de la ovulación con GnRH, LH o hCG estaría indicado para animales con historia de anomalías en la ovulación (Bo & Mapletoft, 2003).

En un ensayo de Nigro et al. (1996b) sobre ganado lechero se evaluaron vacas con historia de mala respuesta superovulatoria, denominadas habitualmente "Vacas Problema". Estas se caracterizan por una baja producción y calidad de embriones, junto a un alto número de folículos anovulatorios detectados por palpación rectal al momento de la colecta. Se practicó un tratamiento convencional con 400 mg de NIH-FSH-P1 en dosis decrecientes durante 4 días y a las 48 hrs de comenzado el tratamiento se les inyectó PGF2 $\alpha$ . Los animales fueron inseminados a las 12 y 24 hrs de comenzado el celo y un grupo también recibió LH intravenosa al momento de la primera I.A. Los resultados mostraron una sustancial mejoría en la producción de embriones en las vacas a las que se les administró LH conjuntamente con la primera inseminación artificial (IA). Otro ensayo realizado con el mismo modelo experimental, pero utilizando ganado lechero sin antecedentes de malas respuestas superovulatorias, no presentó diferencias significativas en los resultados entre los grupos, si bien el número de embriones transferibles fue aparentemente mayor en las donantes que recibieron LH (Nigro et al., 1996a; 1999). Estos datos demuestran que la adición de LH en el momento de la primera IA mejora la respuesta superovulatoria en vacas con problemas manifiestos de ovulación.

#### **4.2.1.5) Dinámica Folicular y Superovulación**

Moor et al. (1984) demostraron que la tasa ovulatoria y el número de embriones viables son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante. Ello explica que, los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, probablemente responderán en forma similar frente a tratamientos subsecuentes y que, los animales que presentan una buena respuesta a los protocolos aplicados, seguirán en dicha línea. Un grupo de investigadores encabezados por Monniaux (1983) discriminaron dos tipos de vacas con pobre respuesta a los tratamientos superovulatorios con gonadotrofinas exógenas. Un primer grupo, en el que se hallaron de 50 a 200 folículos en crecimiento (17 mm de diámetro) por ovario, comparados con los 600 o más folículos hallados en animales de alta respuesta. Este grupo podría explicar su respuesta por la insuficiente masa de folículos frente a la estimulación exógena, condición que sería por tanto inmodificable (Bo & Mapletoft, 2003). Sin embargo, no deben descartarse los intentos de activar mayor número de folículos hacia el estado antral. El segundo grupo de animales que no respondió bien a los tratamientos, tenía un gran número de folículos, pero al momento de iniciar la estimulación gonadotrófica, la mayoría de ellos se hallaban en el proceso de atresia, en forma irreversible (Kanitz et al., 2002). Las vacas de este grupo podrían haber respondido de otra forma, si la acción de las gonadotrofinas hubiera alcanzado los ovarios, previo a que el folículo dominante ejerciera sobre los subordinados la acción inhibitoria que los lleva a la atresia. En este grupo de animales sería posible lograr buenos resultados si los tratamientos se iniciaran coordinados al comienzo de la onda folicular, cuando el folículo dominante y los subordinados estuvieran en fase de crecimiento previo a la desviación (ver Figura 1).

Estos datos indican que existen factores fisiológicos que determinan esta variabilidad en las respuestas observadas a nivel de campo y que, en la mayoría de los casos, están influenciados por el estadio o viabilidad de los folículos de la onda estral, el día que comienzan los tratamientos superestimulatorios. Estudios realizados en la

década pasada demostraron claramente y en forma contundente que, para obtener la mayor respuesta ovulatoria posible es necesario que los tratamientos se inicien antes que se produzca la selección del folículo dominante (Huhtinen et al., 1992; Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994; Bo et al., 2002). La respuesta superovulatoria fue significativamente mayor en los tratamientos iniciados coordinadamente con el inicio de la primera o segunda onda folicular que con aquellos iniciados a las 24 a 48 hrs después (Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994). Esta es la base que explica que el inicio de los tratamientos superovulatorios sea a los 9 a 10 días de detectarse el celo en los tratamientos tradicionales, que en la mayoría de la vacas coincide con el inicio de la segunda onda folicular (Ginther et al., 1989). No obstante, existe una importante variación individual, y la segunda onda puede iniciarse tan temprano como el día 6 o hasta el día 12 del ciclo.

Si tenemos en cuenta esto, la probabilidad de hacer coincidir el comienzo de la estimulación gonadotrófica exógena con el inicio de la onda folicular es de un 20% aproximadamente (1 de 5 a 7 días), lo que significa que los tratamientos superovulatorios no se inician en el período óptimo en el 80% a 90% de las ocasiones (Mapletoft et al., 1990). Además, la necesidad de sincronizar el celo previo ("celo base") en grupos de vacas donantes, para comenzar los tratamientos 9 a 10 días después, implica mayor trabajo de campo y programación y aumenta el riesgo de dispersión de celos, dificultando la colección de embriones en forma oportuna. Una alternativa y en base a estas dificultades es que se desarrollaron los protocolos que controlan la dinámica folicular que permiten comenzar los tratamientos según lo disponga el equipo técnico (Bo & Mapletoft, 2003).

#### **4.2.1.6) Control del Desarrollo Folicular y Superovulación**

Durante los últimos años se han desarrollado varios métodos por los cuales se puede controlar la dinámica folicular en la especie bovina. Estos se pueden dividir en métodos mecánicos y hormonales. Dentro de los primeros, encontramos la ablación folicular, por la cual se aspiran todos los folículos mediante ultrasonografía transvaginal, determinando el comienzo de una nueva onda folicular 1.5 días después (Bergfelt et al., 1994). Dentro de los métodos hormonales, se encuentran aquellos tratamientos con GnRH o LH (Macmillan & Thatcher, 1991) que ocasionan la ovulación del folículo dominante y la utilización de estrógenos y progestágenos que inducen la supresión de los folículos antrales presentes al momento del tratamiento (Bo et al., 1995a y b).

##### *Ablación Folicular*

La ablación folicular es un método eficaz de sincronización del desarrollo folicular donde, al aspirar todos los folículos mayores de 5 mm de diámetro presentes en el ovario y detectados por ultrasonografía, resulta en un aumento significativo de la FSH circulante y ocurre el reclutamiento de una nueva onda folicular 1.5 días más tarde (Bergfelt et al., 1997). En base a estos resultados se desarrollaron ensayos para comparar las respuestas de vacas con el método tradicional de superestimulación al día 8 a 12 del ciclo, en contraposición a un grupo al que se le realizó la ablación folicular, sin importar el estadio del ciclo en que se hallasen y se estimularon con FSH un día después de la aspiración folicular de todos aquellos folículos mayores o iguales a 5 mm

de diámetro, presentes en los ovarios. Al mismo momento se colocó un implante intravaginal de progestágenos para controlar la fase luteal. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos, pero se debe destacar que la variabilidad fue mucho menor en el grupo ablación y que, además esta metodología presenta altas ventajas logísticas, al no deber sincronizar los animales ni detectar celo antes de empezar el programa de superovulación (Bo & Mapletoft, 2003).

El procedimiento de aspiración folicular también fue utilizado por otros programas de superovulación, durante la fase luteal media (días 6 a 9) con lo cual no hubo necesidad del agregado de un dispositivo de liberación lenta de P4, para controlar la fase luteal. La aspiración de todos los folículos presentes (Hill & Kuehner, 1996) o solamente el folículo dominante (Bungarts & Niemann, 1994; Beal, 1999; Hill & Kuehner, 1996; Kim et al., 2001) dos días previos al inicio de la superovulación, resultó en un aumento significativo de la respuesta frente a las vacas, en el mismo período del ciclo estral, con la presencia del folículo dominante. En un trabajo más reciente (Baracaldo et al., 2000) se procedió a aspirar únicamente los 2 folículos de mayor tamaño, aplicando conjuntamente un dispositivo con P4, en vaquillonas ciclando, sin conocer el estadio del ciclo en el que se hallasen, resultando en una respuesta superovulatoria equivalente a aquella lograda con la remoción de todos los folículos mayores de 5 mm de diámetro, mostrando que de esta manera no sería necesaria la determinación de la identidad del folículo dominante y, por lo tanto, simplificando la metodología.

## **Tratamientos Hormonales**

### *GnRH*

El empleo de GnRH se ha vuelto un método muy popular en el control del desarrollo folicular en los últimos tiempos. Los tratamientos con GnRH provocan la ovulación del folículo dominante (Macmillan & Thatcher, 1991) resultando en el surgimiento de una nueva onda de crecimiento folicular (Purseley et al., 1995). Sin embargo, los esquemas de superovulación empleando GnRH y FSH han obtenido pobres resultados en las respuestas superovulatorias (Deyo et al., 2001). La explicación a esto se halla en que, la sincronización ocasionada por la GnRH, es dependiente del estadio en el que se encuentre el folículo dominante al momento de la administración de la hormona y por tanto, la onda sucesiva se inicia de 2 a 5 días posterior (Martínez et al., 1999).

### *Progestágenos y Estrógenos*

Los progestágenos son compuestos sintéticos de acción similar a la progesterona y que se hallan ampliamente difundidos en el mercado desde ya hace algunos años. Dentro de estos se encuentran aquellos de administración oral como el Acetato de Melengesterol (MGA), los implantes subcutáneos y los dispositivos intravaginales, impregnados con progestágenos o progesterona natural. Se utilizan rutinariamente para sincronizar celos para las IA y algunos de ellos, fueron desarrollados antes de la aparición comercial de la PGF2 $\alpha$  para sincronizar celos (Wiltbank et al., 1965). Debido a que en esas épocas no se contaba con la PGF2 $\alpha$

como agente luteolítico, se utilizaban altas dosis de sales de estrógenos como el Valerato de Estradiol (Wilson et al., 1989) o cápsulas de Benzoato de Estradiol (10 mg), que producen luteólisis en forma indirecta. Su accionar sobre la dinámica folicular se descubrió en la década de los 90 cuando, con el advenimiento de la ultrasonografía, se pudo evaluar la dinámica folicular y se observó que los estrógenos ejercían un efecto importante sobre el desarrollo folicular (Bo et al., 1991b).

La combinación de estrógenos y progesterona se basa en el potente efecto supresor que ejercen estos esteroides sobre las gonadotrofinas. Una serie de ensayos fueron utilizados para evaluar el efecto de estas hormonas en la dinámica folicular. Un tratamiento con progestágenos y estrógenos naturales (E-17 $\beta$ ) inducen la supresión de la FSH circulante y producen la atresia de todos los folículos en desarrollo, subsecuentemente (Bo et al., 1994a). Esta atresia es seguida de un pico de FSH y el inicio de una nueva onda folicular 4.3 días posterior (Bo et al., 1994a; 1995a) al tratamiento con E-17 $\beta$ +P4 en promedio. Además, los trabajos determinaron que para una eficiente sincronización del desarrollo folicular, era necesaria la administración de E-17 $\beta$  al día posterior a la inserción del implante de progestágeno (Bo et al., 1994a), o sería aún más efectivo si se administra conjuntamente 50 a 100 mg de progesterona al momento de la inserción del implante (Bo et al., 1996c; Mapletoft et al., 1999). Otros trabajos evaluaron la respuesta superovulatoria en vacas y vaquillonas tratadas con progestágenos+E-17 $\beta$ , para sincronizar el desarrollo folicular y se concluyó que el tratamiento combinado resultó en respuestas superovulatorias similares a las obtenidas en animales superestimulados al inicio de la segunda onda folicular (Bo et al., 1996a). Este protocolo ha sido ampliamente utilizado por muchos grupos que trabajan en transferencia de embriones (Bo et al., 1995a; 1999).

Programas de este tipo están siendo utilizados ampliamente por distintos profesionales y en general la cantidad de embriones obtenidos catalogados como transferibles es similar o aún superior a la de las vacas tratadas convencionalmente entre los días 8 y 12 del ciclo (Bo et al., 1996b; Lewis & Trounson, 1996; Nigro et al., 1996a; Beal, 1999; Fuentes & de la Fuente, 2000; Mapletoft et al., 2000; Nigro et al., 2002). Al no encontrarse en la plaza comercial E-17 $\beta$  alternativamente pueden utilizarse otras sales de estradiol, como es el Valerato de Estradiol (EV) disponible en el mercado asociado a implantes subcutáneos con progestágenos. Los tratamientos consisten en la administración de 1 o 2 implantes subcutáneos en la oreja del animal y la administración simultánea de una solución oleosa vía intramuscular de 3 mg de P4 y 5 mg de EV. La superovulación se inicia a los 5 días de la inserción del implante (Bo et al., 1996c). Al evaluar la efectividad del tratamiento alternativo con el uso de EV versus el original con E-17 $\beta$ , se observó que el intervalo tratamiento-onda fue más variable con el EV (3 a 8 días) que con el E-17 $\beta$  (3 a 4 días) (Bo et al., 1991b; Mapletoft et al. 1999). Además, dos trabajos reportaron un menor número de embriones transferibles colectados en las vacas tratadas con el método con EV que con los originales con E-17 $\beta$  (Mapletoft et al., 1999; Nigro et al., 2002).

El Benzoato de Estradiol (EB) es otra sal disponible en el mercado de muchos países. Se realizaron múltiples ensayos para evaluar la efectividad del EB sobre el control del desarrollo folicular y su efecto en los protocolos de superovulación (Bo et al.,



1996a; 1998; Caccia et al., 1998a; 1998b; Moreno et al., 2001). Los resultados de estos experimentos demostraron que, el EB es el estrógeno que suprime el desarrollo folicular de forma más efectiva (Moreno et al., 2001) y la respuesta superovulatoria es mayor en comparación a las demás sales (Bo et al., 1998) cuando es combinado con P4 intramuscular, al momento de la inserción del dispositivo de liberación prolongada de P4. En relación a las vías de administración de las presentaciones comerciales, se concluyó que las cápsulas intravaginales no fueron efectivas en el control del desarrollo folicular y sí lo fueron las soluciones oleosas inyectables (Bo et al., 1996a). La dosis de 2.0 a 2.5 mg de EB combinadas con 50 mg de P4 vía intramuscular demostraron ser las dosis más efectivas, con un intervalo entre el tratamiento y el inicio de la nueva onda de 4 días (Caccia et al., 1998a; Moreno et al., 2001). Además, con los tratamientos con EB+P4 se obtuvieron un número de embriones transferibles comparables con los tratamientos con E+17 $\beta$ +P4 (Caccia et al., 1998b; 2002). El tratamiento combinado de EB con P4 fue aprobado satisfactoriamente tanto para vacas *Bos taurus* como para *Bos indicus* (Meyer et al., 2000; Nasser et al., 2003).

### 4.3) INTRODUCCIÓN A LA GH

La GH es una proteína de 191 aminoácidos secretada por las células somatotropas de la pituitaria anterior (Brems, 1988). Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico, se transporta por gránulos de secreción que son liberados ante un estímulo específico.

Estas células productoras de GH son las más numerosas de la hipófisis. Cerca de la mitad de la GH secretada, es transportada a través de la circulación en asociación a proteínas que se unen a ella (GHBP).

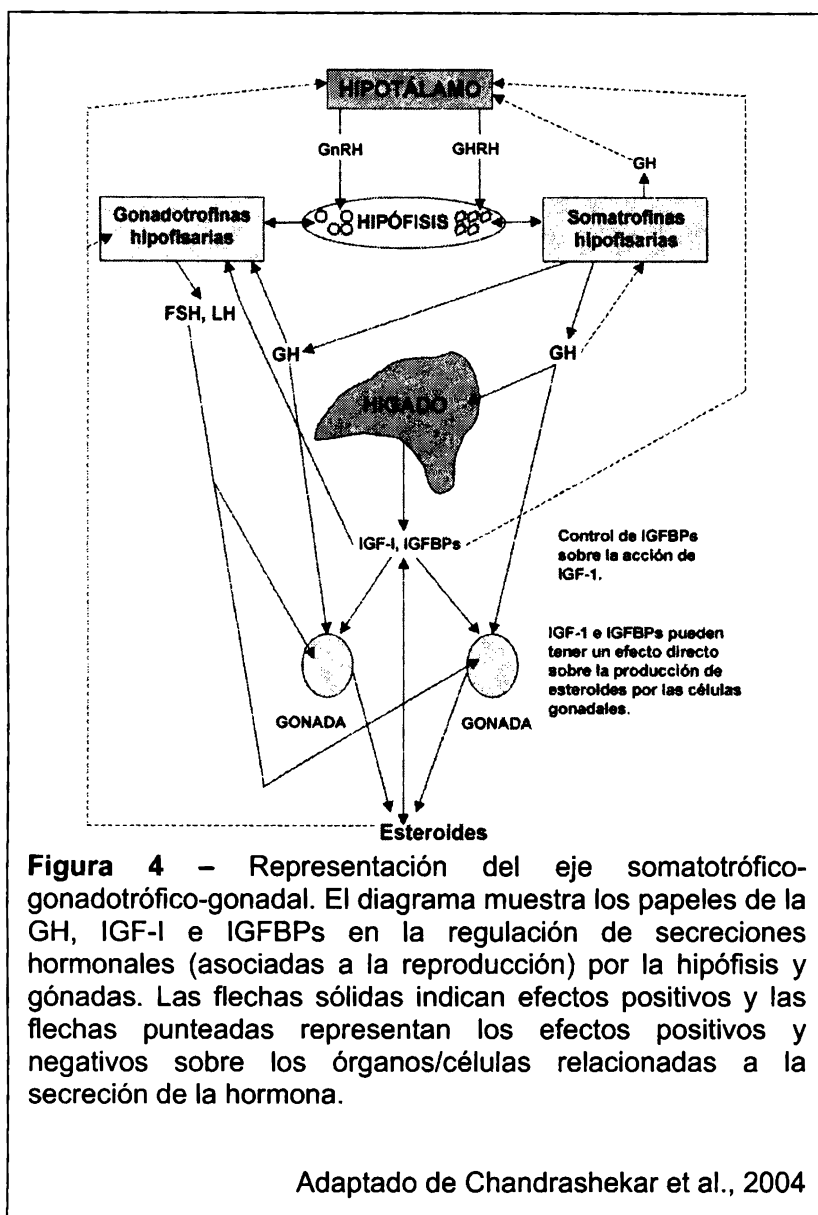
Todos los tejidos sensibles a la GH poseen receptores (GH-R) en las membranas de sus células. Para que la hormona ejerza su efecto, se requiere que se una a estos receptores, los cuales una vez activados, inician una cascada de fosforilaciones de proteínas intermedias, que eventualmente conducen a la activación en el núcleo de factores de transcripción y a los efectos estimulatorios sobre los genes regulados por GH.

Tiene una vida media en el plasma de entre 15 y 20 minutos luego de la secreción o de una inyección intravenosa. Luego de una inyección subcutánea o intramuscular, las concentraciones sanguíneas de GH alcanzan su pico máximo entre 1 y 3 horas posteriores a la inyección y caen hasta niveles indetectables luego de 24 hrs.

La GH circulante se elimina de la sangre a través de una degradación mediada por receptores, principalmente en el hígado y el riñón. Estos órganos internalizan los complejos GH-receptor y completan la degradación hasta obtener los aminoácidos. Solamente mínimas cantidades de GH aparecen en la orina.

La GH estimula varios procesos metabólicos en todas las células, pero una de las acciones mejor entendidas, es la producción de IGF-I (ver Figura 4). La GH estimula la expresión del gen de IGF-I en todos los tejidos. En la mayoría de ellos, el IGF-I ejerce

acciones locales autócrinas y parácrinas, pero el hígado secreta activamente IGF-I hacia la circulación (Chandrashekar et al., 2004).



**Figura 4** – Representación del eje somatotrófico-gonadotrófico-gonadal. El diagrama muestra los papeles de la GH, IGF-I e IGFBPs en la regulación de secreciones hormonales (asociadas a la reproducción) por la hipófisis y gónadas. Las flechas sólidas indican efectos positivos y las flechas punteadas representan los efectos positivos y negativos sobre los órganos/células relacionadas a la secreción de la hormona.

Adaptado de Chandrashekar et al., 2004

Hasta hace poco tiempo se creía que este IGF-I era el responsable de muchas de las acciones de la GH *in vivo*. Datos más recientes muestran que el IGF-I circulante debe ser considerado más como un "marcador" de la acción de la GH en el hígado que como un mecanismo por el cual la GH ejerce sus efectos.

La secreción espontánea de GH es pulsátil. El patrón de secreción de GH depende de la interacción finamente regulada por la GHRH, que constituye un péptido estimulador de su secreción de 44 residuos aminoacídicos (Rivier et al., 1982) y su interacción con la SS en las células somatotropas (somatostatina o péptido inhibitorio, de 12 aminoácidos), es decir, que tanto la GHRH como la SS son requeridas para la secreción pulsátil de GH (Brazeau et al., 1973).

El patrón secretorio de GH es sexualmente dimórfico; los machos exhiben pulsos mayores. El patrón es influenciado por andrógenos y estrógenos: mientras que los primeros regulan la amplitud del pulso, los estrógenos, regulan la secreción basal. A pesar de que los andrógenos y los estrógenos pueden afectar la expresión del gen de la GH en la pituitaria, sus efectos sobre el ritmo circadiano de la secreción de GH, indican que tienen influencia en la secreción de GHRH y/o SS.

#### 4.4) EFECTOS DE LA GH

Los efectos de la GH son diversos, pero a efectos didácticos los podemos dividir en 4 factores: acción anabólica general, acción sobre el metabolismo de los azúcares, efecto lipolítico y promotor de crecimiento (Burton et al., 1994).

1. Anabólico: La somatotrofina cumple actividades anabólicas críticas para la homeostasis metabólica. La principal acción de la GH es estimular la síntesis de proteínas. Es al menos tan poderosa como la testosterona, y sus efectos individuales son aditivos o posiblemente sinérgicos. Además para estimular la síntesis proteica, la GH simultáneamente moviliza grasas por su acción lipolítica directa. Parece más probable que estimule la síntesis de proteínas a través de la movilización de transportadores de aminoácidos, en una manera análoga a los transportadores de glucosa e insulina. El efecto promotor del crecimiento de la GH requiere de numerosos factores, incluyendo efectores nutricionales (principalmente proteínas), reguladores hormonales (ej: insulina y hormona tiroidea), factores específicos de tejidos y factores genéticos. De hecho, cuando se utiliza GH por vía exógena, como las necesidades del organismo de las otras hormonas aumentan (tiroides, insulina, cortico-esteroides, gonadotropina y estrógenos), esto produce un verdadero desequilibrio en el delicadísimo sistema de regulación hormonal.
2. Efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos: ejerce acciones semejantes a las que realiza la insulina, que aumenta la captación y la utilización de glucosa y aminoácidos. Sin embargo, los efectos opuestos ejercidos por la GH y la insulina, son de gran relevancia fisiológica.
3. Efecto Lipolítico: se opone a los efectos lipogénicos de la insulina, y moviliza ácidos grasos para su uso como fuente de combustible durante el ayuno.
4. Estimula el Crecimiento de los Órganos (ej: hipertrofia cardiaca y renal), la producción de hormonas, el metabolismo, el crecimiento y la maduración esquelética y la función inmune. Estos efectos son más fácilmente visibles durante el tratamiento con somatotrofina en humanos con deficiencias en su producción o en animales con GH exógena. Para la expresión máxima de muchos de estos efectos, los tejidos requieren una exposición intermitente, más que continua, a la GH.

La administración de GH aumenta la síntesis proteica, que se refleja en un balance de nitrógeno positivo y un descenso en la producción de urea, y un aumento de la lipólisis, resultando en una disminución de la grasa corporal.

La GH aumenta la producción hepática de IGF-I y ésta modula muchos de los efectos de la GH. Los tratamientos con GH pueden influir en los niveles intrafoliculares de IGFBP, siendo el principal estimulante de la producción hepática de IGFBP-3.

#### **4.4.1) Influencia sobre la Salud de la Ubre**

Desde los inicios de la utilización masiva de la bST en los EE.UU. en la década de los 90 han surgido estudios del efecto hormonal sobre factores inherentes al bienestar animal y los factores productivos implicados en la acción del compuesto.

Hace más de 50 años la bST fue mostrada como alternativa para aumentar la producción de leche a nivel de establecimientos lecheros, pero ese conocimiento no pudo hacerse aplicable hasta que la rbST (somatotrofina bovina recombinante) se desarrolló por técnicas de ingeniería genética (Wingfield et al., 1987; Bauman, 1992). Aumentos excepcionales en la producción de leche (10% a 40%) de vacas tratadas se ha informado en forma consistente después de un tratamiento periódico quincenal, o inyecciones mensuales de bST. Las cantidades administradas han variado desde 5 a 50 mg/dL; las dosis más eficaces varían entre 32 a 40 mg/dL. La magnitud en el aumento de la producción (Bauman, 1992) en respuesta a la bST se influye por factores internos y externos como la calidad del producto, la fase de lactancia en la que se hallan los animales, la temperatura ambiente, los niveles de producción y el potencial genético entre otros.

La mastitis es una enfermedad económicamente importante en la industria de la lechería, los costos asociados a cada caso clínico fueron estimados en los EEUU en aproximadamente U\$S 100,00 (Hoblet et al 1991; Miller et al 1993). Los riesgos de casos clínicos aumentan proporcionalmente al aumento en la producción de leche (Oltenacu & Ekesbo, 1994); por consiguiente, las tecnologías que refuerzan la producción de leche pueden correlacionarse positivamente con la mastitis clínica y aumentar las pérdidas financieras en los tambos comerciales a causa de esta enfermedad. La aprobación de la utilización de bST como estimulante de la producción lechera en los EEUU en vacas lactantes ha causado considerable controversia científica y pública, encima de los potenciales efectos que este producto podría traer sobre la incidencia de ciertas enfermedades como es la mastitis y la utilización subsecuente de antibióticos en la terapia (Kronfeld, 1994). De nueve ensayos analizados en los que se administraron dosis de 500 a 700 mg de bST a intervalos de 14 días, siete estudios (Whitaker et al., 1988; Rijpkema et al., 1990; Thomas et al., 1991; Remond et al., 1991; Eppard et al., 1991; Skarda et al., 1992; Downer et al., 1993) concluyeron que la incidencia de mastitis clínica no difirió entre las vacas tratadas de las testigos. En dos ensayos (Cole et al., 1992; Pell et al., 1992) hubo un aumento significativo en la incidencia de mastitis clínica en las vacas tratadas comparadas con las testigos. Sin embargo, en esos ensayos (Cole et al, 1992; Pell et al, 1992) las vacas que recibieron bST tenían una incidencia significativamente mayor de mastitis antes del tratamiento con bST, lo que podría haber afectado el resultado de los estudios. En una revisión de 15 estudios de lactancias completas en los EE.UU. y Europa (White et al., 1994) 467 lactaciones de vacas tratadas con bST y 447 lactaciones testigo se resumieron en el estudio. La proporción de mastitis clínicas era significativamente superior para las vacas tratadas con bST. Sin embargo, la proporción de mastitis también era significativamente superior durante el período pre-tratamiento para las vacas tratadas posteriormente con bST. Así, la proporción más alta de mastitis clínicas en las vacas tratadas podría haber sido debida a las recaídas de casos previos o a la susceptibilidad aumentada a la

mastitis comparado con el grupo testigo. Sin embargo, cuando las vacas con mastitis previo tratamiento se excluyeron del análisis, la proporción de mastitis clínicas todavía era significativamente más alta para las vacas tratadas con bST. Esa revisión (White et al., 1994) concluye que la bST no altera la relación normal (correlación positiva) que existe entre la producción al ordeño y la mastitis.

En un ensayo de Judge et al. (1997) sobre vacas Holando (n = 555) de cuatro establecimientos lecheros de Michigan, se asignaron al azar los animales para conformar el grupo tratamiento con somatotrofina bovina (bST) y para el grupo testigo. Se administró bST (500 mg) cada 14 días, tratamiento iniciado entre los 63 y 69 días de lactación y que se continuó hasta aproximadamente 21 días antes de ser secadas las vacas. Los objetivos del ensayo eran determinar el efecto de la bST sobre la incidencia de mastitis clínica y número de días que la leche debía ser desviada debido a la terapia antibiótica. Un total de 127 vacas (22.9%) tuvieron casos de mastitis clínica durante la lactancia. En el período pre-tratamiento (antes del día 63 a 69 de la lactancia), ocurrieron 42 de los casos (33.1%), y 85 de los casos (66.9%) ocurrieron durante el ensayo. De los 42 casos de mastitis clínica pre-tratamiento, 57.1% ocurrieron en las vacas del grupo testigo y 42.9% en las vacas tratadas. De los 85 casos durante el ensayo, 47.1% ocurrieron en las vacas testigo y 52.9% ocurrieron en las vacas tratadas. Utilizando regresión logística en la proporción de desigualdades para la ocurrencia de mastitis clínica para las vacas tratadas era 1.06 (con 95% de intervalo de confianza = 0.62 a 1.81). El número de días en que la leche debía ser descartada por la terapia antibiótica frente a la mastitis clínica no difería entre los grupos de estudio.

#### **4.4.2) Efecto sobre Desordenes Metabólicos**

La paresia periparto (fiebre de la leche) ocurre en el 5% al 10% de todas las vacas lecheras adultas en los EE.UU., aunque la incidencia en los establecimientos individuales varía de 0% a 60% (Littledike et al., 1981). Una disminución significativa en la incidencia de esta enfermedad metabólica frente al tratamiento con bST previo al parto ha sido demostrado (Cole et al., 1989; Cole et al., 1992), pero los efectos agudos de la bST sobre los desórdenes metabólicos en vacas lecheras son desconocidos. Un efecto profiláctico de la bST sobre la fiebre de la leche se postuló para vacas lecheras basadas en estos resultados (Cole et al., 1992). Complicaciones asociadas como mastitis, cetosis, retención de placenta y distocias también pueden mejorarse por los efectos de la bST sobre la fiebre de la leche. Eppard et al. (1996) han postulado que la bST podría limitar la fiebre de la leche aumentando la movilización ósea del calcio (Wuster, 1993) y su renovación como se ha demostrado en vacas lactando (Eppard et al., 1991). La somatotrofina (ST) también se ha demostrado eficaz para aumentar las concentraciones sanguíneas de 1,25-dihydroxyvitamina D [ $1,25-(OH)_2D$ ] aumentando la absorción intestinal de calcio en cerdos en crecimiento (Goff et al., 1990). Además, la bST tiene actividad inmunoestimuladora general que podría ser beneficiosa para fortalecer la resistencia a enfermedades y desordenes. Lean et al. (1991) también han postulado una reducción en el riesgo de sufrir desórdenes metabólicos asociado con la movilización lipídica en el período posparto que sigue una lactación en la que las vacas fueron tratadas con bST.

Eppard et al. (1996) para estudiar el posible efecto terapéutico de la bST en la paresia periparto y los desordenes en la salud de la vaca periparturienta asignaron 38 vacas Jersey secas y preñadas a diferentes dietas y tratamientos con bST en un plan de ensayo factorial 2 x 2. Durante el período seco, la mitad de las vacas fue alimentada con una dieta con relación calcio/fósforo normal (0.4% Ca; 0.3 a 0.4% P) y la otra mitad recibió una dieta con TMR ("Total Mixed Ration", o ración total mezclada) alta para calcio (1.5 a 1.6% Ca; 0.4 a 0.7% P). Las dietas altas en calcio se diseñaron para inducir la fiebre de la leche y eran relativamente catiónicas (194 a 293 meq/kg) comparadas con las dietas normales (-131 a 30 meq/kg). Una dieta normal se administró a todos los animales postparto. Las vacas recibieron inyecciones hipodérmicas de un excipiente aceitoso o 500 mg de bST en excipiente de acción prolongada cada 14 días desde 28 días previos a la fecha estimada del parto y hasta aproximadamente 14 días post-parto.

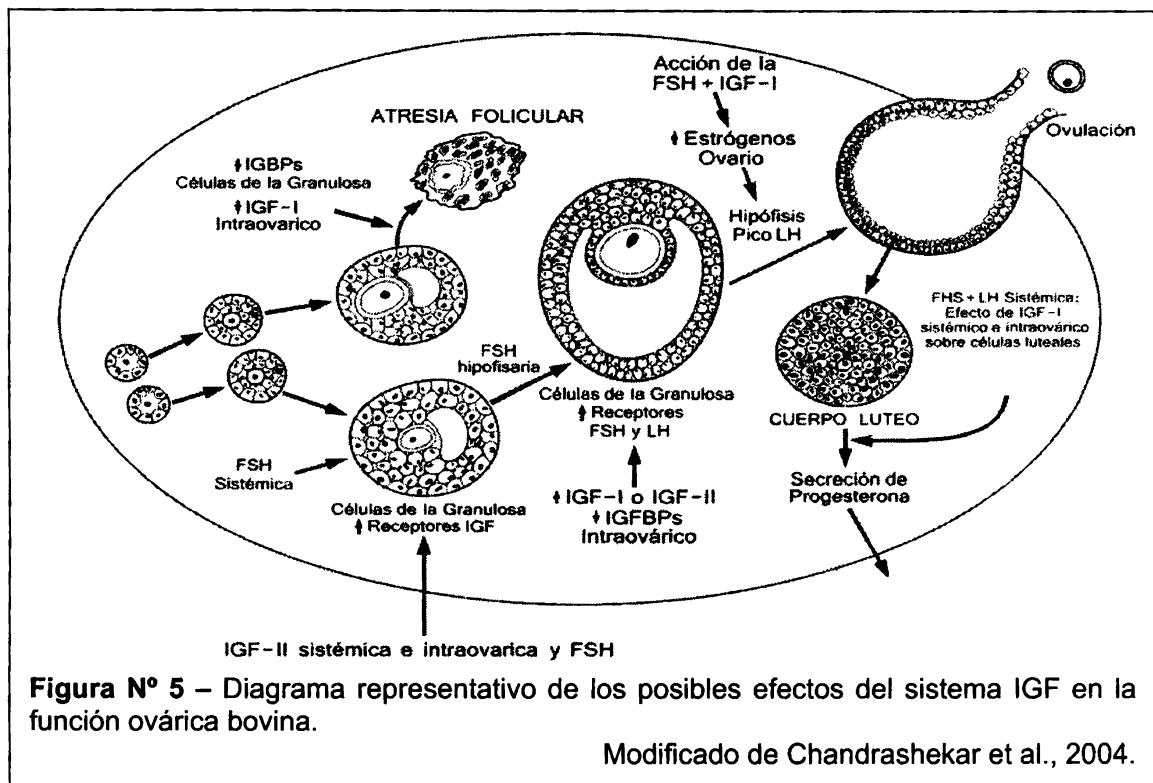
En el periparto, los tratamientos con bST lograron disminuir la incidencia de mastitis clínica, no afectaron la incidencia de fiebre de la leche y aumentó la duración, pero no la incidencia de cetosis en las vacas Jersey. Los datos de metabolitos sanguíneos confirmaron las respuestas clínicas e indicaron que las vacas tratadas movilizaron más calcio óseo que las testigos, como se evidenció por las concentraciones de hidroxiprolina aumentadas como respuesta. El tratamiento con bST no afectó las concentraciones sanguíneas de 1,25-dihydroxyvitamina D, Ca, y Mg. Las dietas altas en calcio aumentaron la incidencia de fiebre de la leche y síndrome de vaca caída en comparación con las dietas normales. Aunque el tratamiento con bST produjo un aumento en la movilización de calcio óseo, el efecto fue insuficiente para prevenir la fiebre de la leche en dicho modelo.

#### **4.4.3) Efectos sobre la Reproducción**

El análisis de los efectos de la deficiencia de la hormona del crecimiento indica que puede influir en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, incluyendo la liberación de gonadotrofinas, acción sobre la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal, en hembras la selección del folículo(s) dominante(s) y la ovulación, maduración del ovocito, fertilidad y lactación; motilidad espermática y la función eréctil en machos.

IGF-I y sus receptores están presentes en los ovarios de muchas especies. Se conoce que IGF-I tiene una función importante en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y estimula la esteroidogénesis, crecimiento de los folículos y las células tecaes. IGF-I actúa como mediador de la acción de las gonadotrofinas (ver Figura 5).

Es considerable la evidencia que la GH tanto a nivel de producción local como sistémica puede ejercer estimulación, sinergismo, o efectos permisivos en cada nivel del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (HPG), en el tracto reproductivo, genitales externos y glándula mamaria. Sin embargo, datos obtenidos en animales transgénicos indican que una elevación crónica de GH y de IGF-I por encima del rango normal, puede interferir con muchos aspectos relacionados a la reproducción (Chandrashekar et al., 2004).



La somatotrofina bovina se utiliza rutinariamente en algunos países para mejorar la producción lechera a través de tratamientos con 500 mg de bST a intervalos de 14 días, logrando mejoras en los rendimientos individuales en el orden de 3 a 5 kg/d (Hartnell et al., 1991, Barman et al., 1999b), sin embargo, algunos estudios han concluido un posible efecto negativo de los tratamientos con bST en la performance reproductiva de vacas lecheras (Morbeck et al., 1991; Cole et al., 1992; Kirby et al., 1997b). En dichos estudios se relacionó el efecto de la dosis administrada, el día de iniciación del tratamiento, la concepción, factores nutritivos y la producción láctea. Otros han sugerido que los posibles efectos negativos de la bST sobre la eficiencia reproductiva en vacas lecheras podría ser medida por la atenuación en la expresión del estro, con la disminución consecuente en las detecciones de celo e inseminación (Morbeck et al., 1991; Cole et al., 1992; Kirby et al., 1997b).

Además de los efectos indirectos de GH vía IGFs, la GH podría ejercer un efecto directo en el ovario. El receptor de GH en la expresión del ARNm y la proteína ligadora de GH (GHBP) se ha descubierto en el ovario de humano y en varias especies animales, incluso los ratones. Varios estudios in-vitro han demostrado que la GH puede afectar la maduración del oocito aumentando los receptores a las gonadotrofinas y de esta manera colaborando en la foliculogénesis. En ratones deficientes en receptores de GH, se ha reducido la tasa de ovulación, el número de folículos antrales, y aumentado el número de folículos atresicos que no podría invertirse con el tratamiento de IGF-I, sugiriendo que GH puede tener un efecto directo en el ovario. Sin embargo, estudios en

ratones GHR-KO revelan una acción más indirecta de GH vía IGF-I que su acción directa en la función ovárica.

Según Poretsky et al. (1999) la GH puede influir potencialmente en la función folicular de 4 maneras distintas:

- 1) Acción directa en las células foliculares a través de los receptores de GH.
- 2) Acción directa a través del aumento en la producción de IGF-I por el ovario.
- 3) Acción sobre el hígado para aumentar la circulación de IGF-I.
- 4) Modular la producción intrafolicular y hepática de IGF-BPs y/o niveles de IGF-BP en el líquido folicular y en la circulación.

La calidad de los oocitos se mejoró en vacas tratadas con bST (Kuehner et al., 1993; Gong et al., 1996). Es posible que la FSH o bST pudieran mejorar la calidad del oocito alterando el ambiente folicular que rodea al mismo en forma directa, o indirectamente vía IGF-I (Echternkamp et al., 1994; Gong et al., 1997; Lucy, 2000).

La bST tiene, entre otros órganos blanco, su acción sobre los ovarios y, dentro de los mismos, efecto sobre los folículos y el cuerpo lúteo (CL) en bovinos. Algunos de los estudios (Schemm et al., 1990; Gallo & Block, 1991; Lucy et al., 1995) han demostrado que las vacas tratadas con bST presentan concentraciones de progesterona aumentadas en la sangre y CL más grande, pero otros (de la Sota et al., 1993; Dalton & Marcinkowski, 1994) no describen efecto alguno de la bST en la función del CL. Un efecto más consistente de la bST fue observado en el crecimiento folicular examinado por varios autores. El número de folículos pequeños (<10 mm) se aumentó en vacas y vaquillonas tratadas con bST (Gong et al., 1991; de la Sota et al., 1993). Además, para vaquillonas tratadas con bST, los folículos secundarios de la onda del ciclo estral se desarrollan antes (Lucy et al., 1994). Este cambio se descubrió como el desarrollo más temprano de folículos preovulatorios grandes tardíos en el ciclo estral.

Los efectos de la bST en los ovarios de vacas probablemente es una combinación de efectos directos de la hormona e indirectos a través de la IGF-I. El ARNm para el receptor de bST se encuentra en el CL de las vacas (Lucy et al., 1993a). Por consiguiente, la bST puede tener efectos directos en el ovario a través de las interacciones con su receptor en el CL. Aunque algunos receptores de bST se encuentran en el CL, la mayor concentración de los mismos se halló en el hígado. En respuesta a la bST el hígado produce IGF-I (Peel & Bauman, 1987). El aumento en las concentraciones sanguíneas de IGF-I causadas por la bST puede tener efectos estimulantes sobre la función ovárica ya que se han identificado receptores para IGF-I en el tejido folicular y luteal (Spicer & Echternkamp, 1995). En estudios in-vitro, la IGF-I aumentó la secreción de progesterona por el CL (Sauerwein et al., 1992) y estimuló la función celular de la granulosa en varias especies (Spicer & Echternkamp, 1995). La secreción hepática de IGF-I representa una acción endocrina indirecta de la bST sobre el ovario. Una tercera senda potencial (nunca demostrada en bovinos) es un efecto directo de la bST sobre el ovario para producir la secreción por parte de éste de IGF-I ovárico que puede actuar entonces de una manera parácrina para estimular la función ovárica (Spicer & Echternkamp, 1995).



La administración de bST no sólo causa aumento en la producción de leche, sino también aumenta la persistencia de la curva de lactancia. Así, el retorno económico del productor por lactancia puede aumentarse sustancialmente con la utilización de bST (Bauman, 1992; 1999a). Las tasas de concepción son similares para vacas inseminadas en el posparto temprano o más tarde (Stevenson et al., 1983). Se ha recomendado reducir los intervalos interparto para aumentar al máximo la rentabilidad grupal asociada con la ganancia marginal que deja la concepción en la lactación temprana. En los años recientes, productores lecheros han justificado intervalos interpartos más largos para vacas de gran producción. Sin embargo, incluso con producciones de leche muy altas, la forma de la curva de lactación no justifica la extensión de la lactancia. Así, la rentabilidad mayor se manifiesta favorablemente con un intervalo entre partos (IEP) más corto y un mayor número de días gestando temprano en la lactancia. Con la administración de bST, las curvas de lactancia se pueden alterar con un aumento inmediato en la producción de leche y mayores persistencias comparadas con las curvas sin bST (Galton et al., 1997). Dentro del posparto, el intervalo parto-concepción en vacas tratadas con bST es mayor (Cole et al., 1991).

La eficiencia reproductiva de vacas lecheras depende tanto de factores intrínsecos (la salud de la vaca y la salud útero-ovárica) como de factores extrínsecos (la detección de celo y lo referente a la inseminación). Otros factores, como la nutrición adecuada y la producción de leche se relacionan a ambos. Varios informes coinciden en que, salvo la incidencia aumentada en mastitis (Burton et al., 1990; Pell et al., 1992) y problemas podales (Cole et al., 1992; Zhao et al., 1992), no existe efecto perjudicial del tratamiento con bST sobre la salud de las vacas. Varios estudios (Burton et al., 1990; Hemken et al., 1991; Morbeck et al., 1991; Cole et al., 1992; Zhao et al., 1992; Oldenbroek et al., 1993) analizaron los efectos adversos del tratamiento con bST sobre la reproducción. En dichos estudios, las consecuencias adversas se relacionaron a la dosis empleada, tiempo de iniciación de los tratamientos, período parto-concepción y actuación de otros factores relacionados, como son: estado nutritivo y producción de leche de las vacas. En general, tratamientos con dosis elevadas de bST se asocian a bajas concepciones y aumentos en el período parto-concepción (Burton et al., 1990). Algunos investigadores han informado aumentada la incidencia de retención de placenta en el posparto, seguida de una lactancia completa bajo administración de bST (Oldenbroek et al., 1993), aumento en los días parto-1<sup>er</sup> servicio (Zhao et al., 1992), incidencia de abortos (Cole et al., 1992), aumento en la ocurrencia de ovulaciones irregulares (Hemken et al., 1991) y descenso en la detección de celo (Morbeck et al., 1991), así como aumento en la ocurrencia de mellizos (Burton et al., 1990). Otros (Pell et al., 1992) no han hallado diferencias de valor significativo, y algunos (Stanisiewski et al., 1992) hasta un efecto beneficioso de la bST en la performance reproductiva.

Los tratamientos con bST recombinante (rbST) aumentaron el número de folículos pequeños reclutados (de la Sota et al., 1993; Kirby et al., 1997a). Numerosos autores han encontrado que la inoculación de somatotrofina produce un aumento en el número de folículos antrales pequeños (Gong et al., 1993; 1996) presumiblemente por un efecto directo de la hormona a nivel folicular a través de receptores propios o a través de otros factores, principalmente IGF-I. Este aumento en el número de folículos

podría estar dado por un efecto anti-atrésico de la GH o por un aumento en el número de folículos reclutados en cada onda folicular.

En un estudio de Roth et al. (2002) intentando mejorar el comportamiento reproductivo de vacas lecheras en otoño se indujo una concentración sostenida de rbST y se encontró la mejora de la morfología del oocito, también produjo el crecimiento de aproximadamente 25 a 30 folículos pequeños más que el grupo testigo. Es notable, sin embargo, que el comportamiento reproductivo mejorado sólo fue logrado siguiendo una inyección de bST inicial. Otro posible medio para mejorar la calidad del oocito en el otoño podría ser combinar los tratamientos cortos con FSH y bST, porque el pretratamiento con bST antes de la estimulación con FSH mejora la competencia del oocito y la calidad del embrión obtenido (Gong et al., 1996; Kuehner et al., 1993). Dos dosis de bST aumentaron el número de folículos pequeños, y este aumento podría asociarse con los mejoramientos de la morfología del oocito observado en el subsecuente ciclo.

Varios estudios (Schemm et al., 1990; Cole et al., 1992; Dalton & Marcinkowski, 1994; Esteban et al., 1994a, 1994b, 1994c) han investigado los efectos a largo plazo de la bST sobre la reproducción de vacas. La mayoría de los investigadores ha concluido que la bST se opone a la función reproductora y produce retrasos en el intervalo interparto y parto-concepción en vacas (días abiertos). Sólo unos estudios (de la Sota et al., 1993; Lucy et al., 1993b; Schemm et al., 1990) han intentado dilucidar los mecanismos asociados con la disminución de la función reproductiva de las vacas tratadas con bST. Además, los estudios reproductivos más intensivos sobre la bST y la función ovárica han involucrado vacas que eran tratadas con bST durante un solo ciclo estral, pero las vacas lecheras en países donde la utilización de bST es permitida como estimulante de la producción láctea, se tratan con bST por períodos más extensos (Kirby et al., 1997b).

Un ensayo clínico fue realizado por Judge et al. (1999) para determinar el efecto de bST en el comportamiento reproductivo en vacas lecheras de raza Holando en los EEUU en tambos que utilizaban bST como estimulante de la producción según indicaciones del fabricante. La regresión logística utilizada en el ensayo para analizar los datos indica que no se encontró efecto significativo del tratamiento con bST en el fracaso reproductivo de las vacas lecheras; la proporción de falta de concepción a los 150 días posparto y el fracaso reproductivo al final de la lactación. En conjunto, la bST no mostró impacto significativo en la performance reproductiva en la muestra analizada en dicho estudio.

En ganado de carne se llevó a cabo un estudio por Andrade et al. (1996) en base a la función ovárica en ganado posparto bajo condiciones de estado corporal medianamente bajo y en anestro y el efecto de la somatotrofina bovina (bST) sobre el desarrollo y función folicular y los perfiles gonadotróficos asociados durante las primeras nueve semanas posparto en vacas de carne. A las 2, 4, 6 y 8 semanas posparto se les administraron 320 mg de bST al grupo tratado. La ovulación ocurrió en el 24% de los animales tratados, mientras que ninguno de los testigos salió del anestro ( $P = 0.10$ ) a la novena semana posparto. El tratamiento con bST no afectó el número de

foliculos pequeños (3-8 mm de diámetro) o grandes (>8 mm de diámetro) o la población de células de la granulosa, pero reforzó las concentraciones de estradiol ( $P < 0.05$ ) e IGF-I ( $P < 0.01$ ) en foliculos grandes al mismo momento. No afectó las concentraciones de testosterona en foliculos grandes significativamente. Las concentraciones circulantes de hormona del crecimiento (GH) e IGF-I era más alto en las vacas tratadas que en las testigo ( $P < 0.001$ ) pero era relativizado los perfiles gonadotróficos y las concentraciones de receptor de gonadotrofinas en los foliculos. En la semana 8 posparto las concentraciones de insulina en plasma se hallaron más altas en las vacas tratadas que en las control antes ( $P < 0.05$ ) y después ( $P < 0.05$ ) de la inyección de glucosa. Se concluyó en dicho estudio que la hormona del crecimiento bovina (bST) puede jugar un papel importante, mediando los efectos del estado nutritivo, en la función ovárica durante el período posparto, posiblemente a través de la alteración intrafolicular de las concentraciones de IGF-I.

Un ensayo de Bartolomé et al. (2002) cuyo objetivo era evaluar el efecto del intervalo en los días de administración de somatotrofina bovina (bST) al día de inicio de la sincronización de ovulación (día 0 y 7) e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en la tasa de concepción en vacas lecheras con y sin quistes ováricos, obtuvo resultados que hicieron pensar que el tratamiento con bST más cerca del día 0 tenía un efecto positivo en la tasa de concepción en vacas sin quistes ováricos, pero el tratamiento con bST más cerca del día 0 y 7 no tenían el efecto sobre la tasa de concepción en vacas con quistes ováricos. Esto fue interpretado como un efecto beneficioso de la bST sobre el folículo preovulatorio y el oocito en las vacas lecheras sin quistes ováricos, pero no en vacas con quistes ováricos.

En los distintos experimentos llevados a cabo para evaluar la acción de la rbST sobre la función ovárica se han utilizado diferentes dosis de la hormona (Gong et al., 1997) por vía parenteral, no observándose cambios en la duración del ciclo estral de los animales tratados, así como tampoco alteraciones en los niveles de gonadotrofinas, progesterona o estrógeno sérico (Gong et al., 1991, 1993, 1997). Trabajos recientes observaron que el tratamiento con rbST produjo un aumento de las concentraciones séricas de hormona de crecimiento (GH), IGF-I e insulina. Ello fue correlacionado positivamente con un aumento en el número de foliculos ováricos, principalmente aquellos menores de 8 mm de diámetro (Gong et al., 1991, 1993, 1997), el aumento de la recuperación de ovocitos así como también una mayor tasa de maduración y calidad ovocitaria.

Un estudio que involucra por encima de 1,200 vacas de 28 tambos norteamericanos, indica que el tratamiento típico aplicado sobre vacas lactando con bST no afectó los días abiertos, los porcentajes de preñez global al final de la lactancia, los nacimientos gemelares ni la incidencia de ovarios quísticos (Collier et al., 2001). De hecho, ensayos con un gran número de vacas en lactancia han demostrado que los tratamientos con bST mejoran la fertilidad de las vacas lecheras inseminadas a tiempo fijo (IATF) (Moreira et al., 2000, 2001) y de vacas consideradas subfértiles (Morales-Roura et al., 2001). Estos efectos de la bST en la fertilidad de vacas en lactación se prueba por los efectos positivos de la hormona de crecimiento (GH) e IGF-I en la fertilización y el desarrollo embrionario (Moreira et al., 2002a, 2002b). Además, bST e

IGF-I influyeron en el desarrollo folicular, funcionalidad de cuerpos lúteos y secreción endometrial de PGF2 $\alpha$ . El tratamiento con bST alteró el desarrollo folicular y el intervalo entre ondas foliculares con la emergencia más temprana de la segunda onda folicular y el crecimiento del folículo (Lucy et al., 1994; Kirby et al., 1997a) y la expresión de receptores de GH en las células luteales (Hull & Harvey, 2001), y ARNm para los receptores de GH en las células luteales (Lucy et al., 1998; Lucy, 2000). Las concentraciones de progesterona en sangre en vacas es superior en aquellas tratadas con bST (Lucy et al., 1994), así como son superiores las concentraciones de progesterona en sangre periférica asociadas con el desarrollo embrionario (Mann & Lamming, 2001) y con un aumento en la fertilidad (Santos et al., 2001). Por lo antedicho, se puede concluir la importancia de la GH como modulador importante en la expresión de la función reproductora normal en hembras bovinas (Hull & Harvey, 2001).

Aunque el tratamiento con bST se ha mostrado interesante para reforzar la fertilidad de vacas lecheras ciclando e inseminadas a tiempo fijo, los efectos de la bST en la concepción y detección de celos en vacas lactando sujetas a diferentes manipulaciones reproductivas en dirección a experimentos con grandes números de animales no se documenta bien (Santos et al., 2004).

Luna-Dominguez et al. (2000), con el objetivo de determinar si existían diferencias en los parámetros reproductivos entre las vacas tratadas con bST y aquellas testigo, analizaron el comportamiento de vacas del sudoeste de los EE.UU. a los 180 días posparto. Se evaluó la tasa de concepción al primer servicio, la fertilidad acumulada y se compararon los días abiertos de ambos grupos. Se partió de un rodeo de 205 vacas Holando, 100 multíparas y 105 primíparas, de dos establecimientos de alta producción en Arizona y California del Sur. Los promedios de producción oscilaban, para ambos establecimientos comerciales, en unos 10,700 kg/año. Los datos reunidos fueron de las pariciones entre diciembre de 1996 y agosto de 1997. El período de espera voluntario era 60 días. Las vacas fueron designadas al azar para recibir tratamiento con bST o ser testigo (sin tratamiento). A los 180 días posparto, el 65.4% (68/104) de las vacas testigo fueron diagnosticadas como preñadas, mientras que en el grupo tratado, el 48.5% (49/101) se hallaba preñado en el mismo intervalo. Los valores fueron analizados por Chi-cuadrado con un modelo lineal que indicó que la preñez difirió significativamente entre los grupos. Con un método similar de análisis, la concepción al primer servicio no difirió entre los grupos. Un período de espera voluntario extendido se recomendó en el ensayo para las receptoras de bST, similar a las sugerencias aplicadas por otros informes.

Un ensayo muy completo aplicado por Esteban et al. (1994c) cuyo objetivo fue determinar si el tratamiento con bST afectaba la performance reproductiva de vacas lactantes se realizó en rodeos de California (EE.UU.). La actuación reproductiva se examinó por las proporciones de distocias, incidencia de retención de membranas fetales, metritis, retardo en la involución uterina, presencia de estructuras quísticas en el ovario, anestro conductual, anestro a la palpación, intervalo parto -1<sup>er</sup> servicio, parto-concepción y abortos. Las posibles diferencias en días al primer estro, servicios por concepción y longitud de la preñez eran también evaluadas para el grupo tratado versus el grupo testigo. También fue analizada la descendencia de las vacas para determinar

diferencias en crecimiento, morbilidad y mortalidad, y la performance reproductiva de las vaquillonas a la reposición.

Se evaluaron las actuaciones reproductivas en lactancias consecutivas de 156 vacas. Se administraron dosis diarias de 17.2; 51.6 y 86 mg de bST/vaca, iniciándose los tratamientos al día 70 post-parto. Durante la primera lactancia se concluyó que las vacas tratadas habían disminuido la proporción de multipartos significativamente, el anestro conductual había aumentado y confirmado por palpación rectal. Las vacas primíparas presentaban ciclos más cortos al reinicio de la ciclicidad. En la segunda lactancia estudiada, las vacas tratadas presentaban una involución uterina retardada por dos días más que las testigos, proporcionalmente, más ovarios quísticos, anestro conductual confirmado por palpación. La descendencia de la primera lactancia se evaluó en relación al crecimiento, la morbilidad y mortalidad, y su actuación como reproductoras no existiendo ninguna diferencia descubierta entre los distintos grupos.

Murphy et al. (1991a) evaluaron el efecto de la bST sobre la ganancia diaria así como la edad a la pubertad de vaquillonas Holando. Se asignaron dos grupos, donde el grupo tratado recibió 15 mg de bST diariamente, mientras que con la misma frecuencia y volumen, al grupo control se le administró un placebo. Las inyecciones hipodérmicas de bST se administraron desde los 7 meses de edad y por 120 días hasta alcanzar la pubertad que fue determinada por concentraciones de progesterona en sangre. Se pesaron las vaquillonas cada 2 semanas y fueron sangradas 2 veces cada 7 días hasta alcanzar los 200 kg. Las vaquillonas fueron servidas entre los 16 y 18 meses de edad. Aunque los animales asignados al tratamiento tuvieron una ganancia diaria menor en 12.5% y en promedio tardaron 20 días en alcanzar la pubertad las diferencias no fueron significativas. Tampoco se hallaron diferencias en otros parámetros medidos en la primera lactancia como composición del fluido y eficacia reproductiva.

#### **4.4.3.1) Ensayos con bST en Protocolos de Superovulación**

Los tratamientos con somatotrofina bovina recombinante (rbST) aumentan el número de folículos antrales de 2-5 mm de diámetro en animales adultos (Gong et al., 1991). Se ha sugerido que la población de folículos ováricos mayores de 1.7 mm de diámetro presentes al momento del tratamiento gonadotrófico, pueden ejercer un rol importante determinando la subsecuente respuesta superovulatoria (Monniaux et al., 1983). Por consiguiente, si los folículos pequeños inducidos por el tratamiento con rbST son funcionalmente activos, el aumento en los números de folículos antrales pequeños inducidos por el tratamiento con bST podría reforzar la respuesta superovulatoria.

En un estudio de Moreira et al. (2002a), cuyo objetivo era determinar los efectos de la bST en la fertilización y desarrollo temprano de embriones luego de que las vacas donantes recibieran un tratamiento de superovulación así como la sobrevivencia después del traslado a las receptoras y la evaluación de los tratamientos de receptoras con bST y su influencia en la tasa de preñez final, concluyó que la administración de bST previa IATF disminuyó el número de ovocitos no fertilizados, aumentó el porcentaje de embriones transferibles y estimuló el desarrollo embrionario en la fase de blastocisto. Es más, la bST afectó el desarrollo embrionario temprano y componentes específicos

de las receptoras que aumentaron la tasa final de sobrevivencia del embrión en el ciclo siguiente.

La somatotrofina bovina recombinante (rbST) se ha mostrado eficaz para aumentar el crecimiento folicular en el ganado y algunos estudios han demostrado un aumento en la respuesta superovulatoria en vacas tratadas con rbST. También se ha demostrado un aumento en los índices de preñez en protocolos que administraron rbST al momento de la inseminación o previo al traslado de los embriones. La aplicación de rbST con el propósito de aumentar la respuesta superovulatoria en animales donantes y los índices de preñez en vacas receptoras se probó en un programa de transferencia de embriones a nivel comercial. En un grupo de ensayos aplicados por Hasler et al. (2003), vacas donantes (n = 56) sufrían tres ciclos de superovulación de prueba (dos antes y uno después de ser testeadas) y recibían cuatro protocolos de superovulación adicionales con tratamientos con rbST (500 mg rbST; n = 28) o excipiente (testigo; n = 28) una vez cada 14 días. En un segundo ensayo, vacas en lactación donantes (n = 37) se introducían en tratamientos de superovulación y durante la lactancia eran tratadas con rbST (n = 16) o excipiente (n = 21). En el experimento N° 3, vacas receptoras que participaban de protocolos de transferencia de embriones in-vitro o in-vivo eran tratadas con rbST (n = 146) o excipiente (n = 143) al momento de la transferencia de los embriones. En el tratamiento sobre no lactantes (Experimento 1) o lactantes (Experimento 2) las vacas donantes tratadas con rbST durante la superovulación no se diferenciaron de las testigos en forma significativa por el número de cuerpos lúteos, la suma de embriones transferibles, embriones degenerados y oocitos no fertilizados. En el tratamiento de vacas receptoras con rbST (Experimento 3) los índices de preñez para embriones in-vitro o in-vivo no variaron. Estos autores concluyeron que la respuesta superovulatoria y la tasa de preñez (respectivamente) es similar al testigo para vacas rbST-tratadas que sufren superovulaciones repetidas y tratamientos con rbST sobre vacas receptoras tratadas al momento de la transferencia de los embriones.

## **5) MATERIALES Y MÉTODOS**

El ensayo se realizó entre mayo y noviembre de 2006 en un Centro de Transferencia de Embriones habilitado por el DILAVE Dr. Miguel C. Rubino del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca y registrada en la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) con el número E 1695; situada en el km 103 de la Ruta Nacional N° 6, Departamento de Florida.

Sesenta donantes de raza Holando de pedigree inscripto en producción, entre 85 y 150 días posparto, de 5 a 10 años de edad, con un promedio 3 de condición corporal (Escala 1-5) y sin antecedentes de infertilidad fueron superovuladas en grupos de 4 donantes de acuerdo al siguiente protocolo:

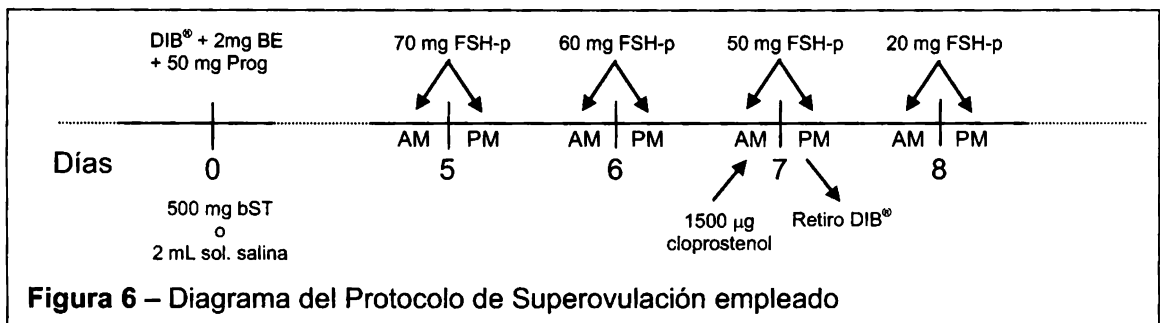
- **Día 0 (pm):**

- ❖ Inserción de un dispositivo intravaginal de silicona inerte con 1 gr de progesterona natural (DIB<sup>®</sup>, Syntex S.A., Argentina), administración IM de 2 mg de benzoato de estradiol en solvente oleoso (Benzoato de Estradiol<sup>®</sup>, Syntex S.A.,

Argentina) y 50 mg IM de progesterona (Progesterona<sup>®</sup>, Laboratorio Río de Janeiro, Argentina).

- **Día 5:**
  - ❖ (AM): Administración IM de 70 mg de FSH-p (Folltropin V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Canada Inc) de acuerdo al protocolo de González et al., (1990). Lote N°: R5KO6V.
  - ❖ (PM): Administración IM de 70 mg de FSH-p.
- **Día 6:**
  - ❖ (AM): Administración IM de 60 mg de FSH-p.
  - ❖ (PM): Administración IM de 60 mg de FSH-p.
- **Día 7:**
  - ❖ (AM): Administración IM de 50 mg de FSH-p, 1,500 microgramos IM de Cloprostenol (Ciclase<sup>®</sup>, Syntex S.A., Argentina).
  - ❖ (PM): Administración IM de 50 mg de FSH-p y retiro del dispositivo intravaginal de silicona inerte.
- **Día 8:**
  - ❖ (AM): Administración IM de 20 mg de FSH-p.
  - ❖ (PM): Administración IM de 20 mg de FSH-p.

Las donantes fueron distribuidas aleatoriamente en 2 grupos: Grupo bST (n = 30) y Grupo Control (n = 30). En el Día 0 del protocolo de superovulación, el Grupo bST recibió 500 mg vía SC de Sometribove Zinco (Lactotropin<sup>®</sup>, Elanco Animal Health, USA) mientras que el Grupo Control recibió 2 mL SC de solución salina fisiológica. En el diagrama siguiente (Figura 6) se esquematiza el protocolo empleado:



**Figura 6 – Diagrama del Protocolo de Superovulación empleado**

Las donantes fueron inseminadas aleatoriamente con semen de sanidad y fertilidad conocida proveniente de 24 toros diferentes a las 12 y 24 hrs respectivamente luego de iniciado el estro. Las donantes que no presentaron celo luego del protocolo de superovulación fueron excluidas del experimento (5 en el grupo bST y 2 en el grupo control).

La colecta de los embriones se realizó por el método no quirúrgico (transcervical) entre el séptimo y octavo día luego de iniciado el estro. Conjuntamente a este

procedimiento se palparon los ovarios, recabando información acerca del número de cuerpos lúteos encontrados y su ubicación.

Se aplicó 5 mL de lidocaína al 2% vía epidural a los efectos de minimizar las contracciones rectales. Se utilizó como medio de lavado uterino una solución de fosfato salino buferado (PBS) con 0.1% de alcohol polivinílico como agente surfactante y kanamicina y gentamicina como antibióticos (Vigro Complete Flush<sup>®</sup>, AB Technology, USA). El medio obtenido se transfirió por una unidad concentradora de embriones (EmCom Filter<sup>®</sup>, USA) y se colocó en placas de Petri estériles de 12 cm de diámetro para ser examinado bajo lupa estereoscópica para la búsqueda y aislamiento de diferentes estructuras. Las estructuras obtenidas son pasadas mediante pipetas Pasteur estériles a placas de Petri de 3.5 cm de diámetro conteniendo una solución de fosfato salino buferado enriquecido con Factor V de albúmina sérica bovina y antibióticos (Vigro Holding Plus<sup>®</sup>, AB Technology, USA). La nomenclatura utilizada para las diferentes estructuras se basó en estándares internacionales de acuerdo a su morfología y estadio de desarrollo: infértiles, degenerados y embriones viables (4: mórula compacta, 5: blastocisto inicial, 6: blastocisto, 7: blastocisto expandido, 8: blastocisto eclosionante). Los embriones viables fueron clasificados de acuerdo a su calidad morfológica en Grado 1 (excelente y bueno), Grado 2 (regular) y Grado 3 (pobre).

La leche de las donantes a las que se les administró la rbST fue eliminada durante los días del tratamiento y el período de espera recomendado por el fabricante.

Los parámetros a evaluar fueron: total de estructuras colectadas, porcentaje de embriones viables, porcentaje de donantes con ningún embrión viable, media o mediana de cuerpos lúteos palpados y embriones viables.

El análisis estadístico para la comparación del total de estructuras colectadas, porcentaje de embriones viables y donantes con ningún embrión viable fue el Test de Fisher. Para la comparación de medias o medianas se empleo el Test de Kolmogorov – Smirnov o el Test de Shapiro – Wilk para determinar la distribución de los valores obtenidos. De no existir distribución Gaussiana se utilizaría un test no Paramétrico (Mann-Whitney), y de haberla un test paramétrico (Test de Student no apareado) (Motulsky, 1995).

## **6) RESULTADOS**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico GraphPad InStat Versión 3.0 (1997).

Se analizó la distribución de los valores en relación al total de estructuras obtenidas, porcentaje de embriones viables, cuerpos lúteos palpados al momento de la colecta, porcentaje de estructuras infértiles y degeneradas obtenidas, hallando en todos los casos, excepto para el parámetro de porcentaje de embriones degenerados, distribución Gaussiana, a través del Test de Kolmogorov y Smirnov por lo cual los grupos fueron comparados por un test paramétrico (Test de Student no apareado). Para el porcentaje de estructuras degeneradas colectadas se planteó aplicar un test de T no



apareado con corrección de Welch, pero frente al resultado negativo de distribución gaussiana de las poblaciones, finalmente se optó por un método estadístico no paramétrico, como lo es Mann-Whitney.

Para la medida de cantidad total de ovocitos colectados, el análisis mediante el Test de Kolmogorov y Smirnov resultó en valores de 0.2312 para el grupo bST y 0.1736 para el grupo control, dando en ambos casos valores de P mayores de 0.10 superando el test de normalidad.

La comparación de medias a través del test no paramétrico resultó en un valor de P entre grupos de 0.5445 considerándose, por tanto, diferencias no significativas. Siendo el valor de T = 0.6100 con 51 grados de libertad.

Se calculó la posible existencia de diferencia entre desvíos estándar entre grupos, hallando un F = 1.098 con un valor de P = 0.4043 con lo cual se concluye que las diferencias entre éstos tampoco son significativas (Cuadro I).

**Cuadro I.** Resumen de datos para la variable cantidad de ovocitos colectados.

<b>Parámetro</b>	<b>bST</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Media</b>	10.000	8.821
<b>N</b>	25	28
<b>Desvío estándar</b>	7.194	6.864
<b>Error en el Desvío estándar</b>	1.439	1.297
<b>Valor Mínimo</b>	0.000	0.000
<b>Valor Máximo</b>	27.000	24.000
<b>Mediana</b>	9.000	7.000
<b>Valores por debajo del percentil 95</b>	7.030	6.160
<b>Valores por encima del percentil 95</b>	12.970	11.483

En relación al porcentaje de embriones viables del total de estructuras obtenidas, utilizando el Test de Student no apareado, comparando las medias entre los grupos de tratamiento, resultaron en 36.5% para el grupo tratado con bST y 54.9% para el grupo testigo, obteniendo un valor de P = 0.0588 considerado como no significativo (ver cuadro II). El valor de T es de 1.933 con 51 grados de libertad.

**Cuadro II.** Resumen de datos para la variable porcentaje de embriones viables.

<b>Parámetro</b>	<b>bST</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Media</b>	0.365	0.549
<b>N</b>	25	28
<b>Desvío estándar</b>	0.325	0.365
<b>Error en el Desvío estándar</b>	0.065	0.069
<b>Valor Mínimo</b>	0.000	0.000
<b>Valor Máximo</b>	1.000	1.000
<b>Mediana</b>	0.250	0.521
<b>Valores por debajo del percentil 95</b>	0.230	0.408
<b>Valores por encima del percentil 95</b>	0.499	0.691

Con un intervalo de confianza de 95% la diferencia entre medias de grupos fue de 0.1845. Se calculó asimismo la posible existencia de diferencias entre desvíos estándar entre grupos, hallando un  $F = 1.257$  con un valor de  $P$  de 0.2874 con lo cual se concluye que las diferencias entre desviaciones estándar no son significativas.

En relación al número de CL palpados al momento de la colecta de estructuras al día séptimo u octavo de iniciado el estro y, primeramente para comprobar la validez del test propuesto (Test de Student), que asume que las poblaciones estudiadas poseen igual desvío estándar, se calculó el valor de  $F = 1,699$  y  $P$  que asume el valor de 0.0967, lo cual sugiere que las diferencias no son significativas.

El test también presume que los datos de la población poseen distribución normal o gaussiana, para probar este punto se utilizó el test de Kolmogorov y Smirnov, resultando en valores de  $P$  para ambos grupos  $>0.10$ , superando de esta manera el test de normalidad.

En el Cuadro III se presenta el resumen de datos para esta variable.

**Cuadro III.** Resumen de datos para la variable número de CL palpados al momento de la colecta.

<b>Parámetro</b>	<b>bST</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Media</b>	9.440	9.893
<b>N</b>	25	28
<b>Desvío estándar</b>	4.917	6.408
<b>Error en el Desvío estándar</b>	0.983	1.211
<b>Valor Mínimo</b>	0.000	0.000
<b>Valor Máximo</b>	18.000	20.000
<b>Mediana</b>	10.000	10.000
<b>Valores por debajo del percentil 95</b>	7.410	7.408
<b>Valores por encima del percentil 95</b>	11.470	12.378

Aplicando el test de Student no apareado, el valor de  $P$  entre grupos asume un valor de 0.7760, considerado como no significativo, con un  $T = 0.2860$ , con 51 grados de libertad.

Se comparó también el porcentaje de estructuras infértiles obtenidas del total colectado, en la búsqueda de la influencia que podría generar el empleo de la bST sobre la viabilidad y fertilidad de los ovocitos producidos por el protocolo de superovulación. Resultó que habiendo superado las presunciones, para aplicar un test paramétrico (Test de T), utilizando un intervalo de confianza del 95%, el valor de  $T$  fue igual a 1.095, considerándose las diferencias encontradas como no significativas (Cuadro IV).

**Cuadro IV.** Resumen de datos para la variable porcentaje de estructuras infértiles colectadas.

<b>Parámetro</b>	<b>bST</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Media</b>	0.413	0.305
<b>N</b>	25	28
<b>Desvío estándar</b>	0.382	0.340
<b>Error en el Desvío estándar</b>	0.077	0.064
<b>Valor Mínimo</b>	0.000	0.000
<b>Valor Máximo</b>	1.000	1.000
<b>Mediana</b>	0.430	0.170
<b>Valores por debajo del percentil 95</b>	0.255	0.173
<b>Valores por encima del percentil 95</b>	0.571	0.436

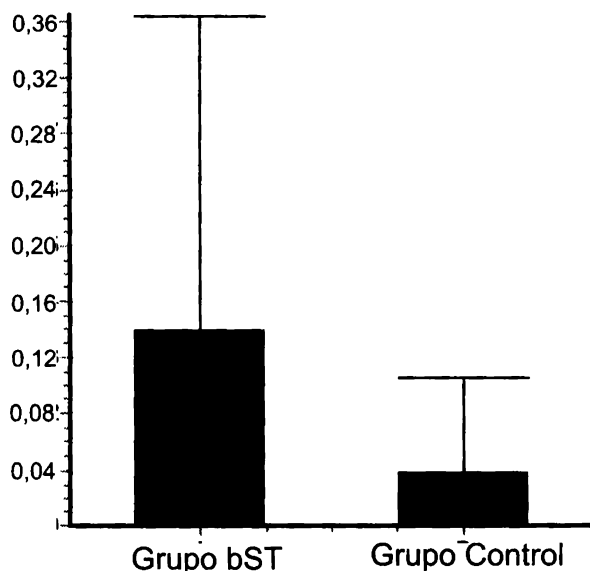
Se analizó también la variabilidad resultante del porcentaje de estructuras degeneradas encontradas del total colectado, ya que este parámetro, conjuntamente con el anterior mencionado (estructuras infértiles) nos permiten derivar en atribuciones en la calidad de los productos obtenidos mediante los tratamientos superovulatorios aplicados.

El valor de P asumió el resultado de 0.1648 al estimarse, basándose en la aproximación normal, considerándose no significativo. El resumen de los datos se aporta en el Cuadro V.

**Cuadro V.** Resumen de datos para la variable porcentaje de estructuras degeneradas del total obtenido.

<b>Parámetro:</b>	<b>bST</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Media</b>	0.143	0.039
<b>N</b>	25	28
<b>Desvío estándar</b>	0.230	0.070
<b>Error en el Desvío estándar</b>	0.047	0.013
<b>Valor Mínimo</b>	0.000	0.000
<b>Valor Máximo</b>	1.000	0.250
<b>Mediana</b>	0.000	0.000
<b>Valores por debajo del percentil 95</b>	0.048	0.012
<b>Valores por encima del percentil 95</b>	0.238	0.066

En la Figura 7 se muestran las medias y desvíos estándar para el parámetro en estudio. Se divisa claramente la estabilidad en los valores asumidos por el grupo control frente al grupo tratado.



**Figura 7.** Gráfico de medias y desvíos estándar para la variable porcentaje de estructuras colectadas en estado de degeneración.

## **7) DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Para el parámetro estudiado correspondiente al total de estructuras colectadas para el tratamiento con somatotrofina bovina recombinante (rbST) frente al control no se encontraron diferencias entre grupos, con promedios de  $10.0 \pm 7.19$  (media  $\pm$  DE) para el grupo tratado frente a  $8.82 \pm 6.86$  del control. Esta respuesta no resultó relevante para el nivel de significación del 95% fijado. No coincide con los hallazgos registrados por Gong et al. (1993 y 1996) quienes encontraron que el pretratamiento con bST en tratamientos superovulatorios provocó un aumento marcado en la colecta de estructuras. Es de destacar el tamaño de los grupos empleados corrientemente en los ensayos experimentales por la bibliografía internacional, por ejemplo, Gong et al. (1996) utilizaron grupos de 8 animales.

Los resultados en referencia a la variabilidad de las respuestas obtenidas por las donantes, correspondieron a los publicados por varios autores (Looney, 1986; Hahn, 1992; Mapletoft et al., 2002; Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004) con desvíos de valores muy significativos, que concuerdan con los registrados en el presente ensayo. En un trabajo de Looney (1986) donde evaluó la respuesta de 2,048 colecciones de embriones donantes bovinas destacó la variabilidad de la respuesta al tratamiento, donde obtuvo un 25% de colecciones inviábiles, 64% de las donantes que produjeron menor cantidad de embriones que el promedio y 30% de colecciones donde se obtuvieron el 70% de las estructuras transferibles. Para el ensayo aplicado, dentro del grupo bST se obtuvieron un 24% de colecciones inviábiles y para el grupo control 21.4% del total de colecciones no obtuvieron estructura transferible alguna. Estos resultados concuerdan con los publicados por Looney (1986), ratificados posteriormente por Hahn (1992).

Continuando con la comparación de las respuestas registradas por Looney (1986) quien obtuviera un 64% de donantes con menor producción de embriones que el promedio, en nuestro ensayo dicho parámetro fue del 68% para el grupo tratado frente al 50% para el grupo control. De un 24% de las colecciones para el grupo bST y 36% para el grupo control se obtuvieron el 70% de estructuras transferibles, frente al 30% registrado por Looney (1986). Los resultados concuerdan con los publicados por varios autores (Hahn, 1992; Mapletoft et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004), empleando diferentes tratamientos hormonales para los protocolos superovulatorios. Asimismo, la variabilidad presentada por el grupo bST fue superior al grupo control.

Kanitz et al. (2002) atribuyen una importante influencia, dentro de la respuesta a los tratamientos, a las gonadotrofinas empleadas, las dosis totales y dosificaciones utilizadas, la vía de administración, así como el momento del inicio del tratamiento y el lote del producto utilizado. Para que los datos obtenidos sean comparables con los publicados fue que se empleó un protocolo convencional y comercial, con dosis decrecientes de FSH-p (extracto pituitario altamente purificado) y una cantidad total de 400 mg del producto en administración IM (dosis óptima convencional para ganado lechero). Para trabajar libremente con los grupos de animales, independientemente del momento del ciclo en que se hallasen, fue que se emplearon dispositivos intravaginales de silicona inerte, conjuntamente con estradiol y progesterona IM.

A partir de estudios publicados por Gong et al. (1991) donde analizaron el efecto consistente de la bST en el crecimiento y reclutamiento de folículos pequeños (<10 mm) y su posible trascendencia en la respuesta superovulatoria surgió la posibilidad de su empleo en protocolos reproductivos. El mismo autor en 1993 reportó un aumento significativo en el número de estructuras colectadas con la adición de bST, así como el posible efecto en la reducción de la variabilidad en las respuestas individuales al tratamiento. A su vez Hasler et al. (2003), ensayaron el efecto de la bST en la respuesta sobre animales donantes y receptoras, secas y lactantes y concluyeron que las vacas donantes tratadas con rbST durante la superovulación no se diferenciaron de las testigos en forma significativa a través del número de cuerpos lúteos, la suma de embriones transferibles, embriones degenerados y oocitos no fertilizados. Este último ensayo reportó resultados similares al ensayo experimental desarrollado, donde los parámetros de estructuras totales colectadas, embriones transferibles, degenerados e infértiles, así como cuerpos lúteos palpados no se diferenciaron en forma significativa entre grupos. Es de destacar que los grupos empleados por Hasler et al. (2003) tenían un tamaño similar al propuesto por nosotros.

Se puede concluir que, según los resultados encontrados en el presente ensayo, conjuntamente con los hallazgos disímiles hallados por otros autores, no se ha demostrado concluyentemente que los tratamientos con bST en protocolos superovulatorios favorezcan la respuesta en forma cuantitativa ni cualitativa a través de la cantidad y/o calidad de las estructuras halladas. Se requieren mayores estudios al respecto.

Los hallazgos encontrados, conjuntamente con los desiguales resultados, publicados en la bibliografía de referencia descartarían, en forma primaria, hasta aundar en mayores estudios, la utilización de la rbST en pretratamientos de protocolos de superovulación, con los concernientes gastos y sobreefectos hormonales.

Los efectos descriptos por muchos autores y que iniciaron, desde ya hace muchos años, trabajos concernientes a develar los efectos reproductivos de la somatotrofina bovina sobre los parámetros y reacciones del ovario, no fueron encontrados en las determinaciones efectuadas en este estudio. La posible acción de la bST sobre la fisiología ovárica no se resolvió en resultados plausibles que determinarían diferencias como corolario de este ensayo.

## **8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Adams G. P., Matteri R. L., Kastelic J. P., Ko J. C. H. and Ginther O. J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*; 94: 177-188.
2. Adams G. P., Kot K., Smith C. A., Ginther O. J. (1993a). Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*; 30: 259-271.
3. Adams G. P., Kot K., Smith C. A., Ginther O. J. (1993b). Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can J Anim Sci*; 73: 267-275.
4. Adams G. P. (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*; 41: 19-24.
5. Adams G. P., Nasser L. F., Bo G. A., García A., Del Campo M. R., Mapletoft R. J. (1994b). Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*; 42: 1103-1113.
6. Adams G. P. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*; 54: 17-32.
7. Adashi E. Y., Resnick C. E., D'Ercole A. J., Svoboda M. E., Van Wyk J. J. (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev*; 6: 400.
8. Andrade L. P., Rhind S. M., Wright I. A., McMillen S. R., Goddard P. J., Bramley T. (1996). A. Effects of bovine somatotrophin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows. *Reprod Fertil Dev*; 8 (6): 951-960.
9. Armstrong D. G., Hogg C. O., Campbell B. K., Webb R. (1996). Insulin like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells: the effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. *Biol Reprod*; 55: 1163-1171.
10. Armstrong D. T. (1993). Recent Advances in Superovulation of Cattle. *Theriogenology*; 39: 7-24.
11. Austin E. J., Mihm M., Evans A. C. O., Knight P. G., Ireland J. L. H., Ireland J. J. and Roche J. F. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod*; 64: 839-848.

12. Baracaldo M. I., Martínez M., Adams G. P., Mapletoft R. J. (2000). Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*; 53: 1239-1250.
13. Barros C. M. & Nogueira M. F. G. (2004). Superovulação em zebuínos de corte. In: 1º Siompósio Internaonal de Reprodução Animal Aplicada. Londrina. Pp: 212-222.
14. Bartolome J., Hernández J., Landaeta A., Kelleman A., Sheerin P., Risco C A., Archbal L. F. (2002). The effect of interval from day of administration of bovine somatotropin (bST) to synchronization of ovulation and timed-insemination on conception rate of dairy cows with and without ovarian cysts. *Theriogenology*; 57 (4): 1293-1301.
15. Bauman D. E. (1992). Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci*; 75: 3432-3451.
16. Bauman D. E. (1999a). Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol*; 17 (2-3): 101-116.
17. Bauman, D. E., Everett R. W., Weiland W. H., and Collier R. J. (1999b). Production responses to bovine somatotropin in northeast dairy herds. *J Dairy Sci*; 82: 2564-2573.
18. Beal W. B. (1999). Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18<sup>th</sup> Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, EE.UU. Pp.: 66-77.
19. Bellows R. A., Staigmiller R. B., Wilson J. M., Phelps D. A., Darling A. (1991). Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*; 35: 1069-1082.
20. Bergfeld E. G. M., Kojima F. N., Cupp A. S., Wehrman M. E., Peters K. E., Mariscal V., Sanchez T., Kinder J. E. (1996). Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 $\beta$ -estradiol in bovine females. *Biol Reprod*; 54: 546-553.
21. Bergfelt D. R., Lightfoot K. C., Adams G. P. (1994). Ovarian Synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*; 42: 895-907.
22. Bergfelt D. R., Bo G. A., Mapletoft R. J., Adams G. P. (1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod Sci*; 49: 1-12.
23. Biedl A. et al. (1922). Experimentelle Studien über die Einnistung und Weiterentwicklung des Eies im Uterus. *Z. Geburtshilfe Gynak*; 84: 59-130.
24. Blat C., Delbe J., Villaudy J., Chatelain G., Golde A., Harel L. (1989). Inhibitory diffusable factor-45 bifunctional activity: as a cell growth inhibitor and as an insulin-like growth factor I-binding protein. *J Biol Chem*; 264: 12.449.
25. Bo G. A., Hockley D. K., Tribulo H., Jofre F., Tribulo R., Busso N., Barth A. D., Mapletoft R. J. (1991a). The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folitropin in the cow. *Theriogenology*; 35: 186 (resumen).
26. Bo G. A., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1991b). The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology*; 36: 169-183.

27. Bo G. A., Adams G. P., Nasser L. F., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1993). Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*; 40: 225-239.
28. Bo G. A., Hockley D. K., Nasser L. F., Mapletoft R. J. (1994a). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology*; 42: 963-975.
29. Bo G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Caccia M., Tribulo H., Mapletoft R. J. (1994b). Follicular wave dynamics alter estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*; 41: 1555-1569.
30. Bo G. A., Adams G. P., Caccia M., Martínez M., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1995a). Ovarian Follicular wave emergente alter treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*; 39: 193-204.
31. Bo G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1995b). Exogenous control of follicular development in cattle. *Theriogenology*; 43: 31-40.
32. Bo G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1996a). Effect of progestogen plus estradiol-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*; 45: 897-910.
33. Bo G. A., Bergfelt D. R., Mapletoft R. J. (1996b). Follicle wave dynamics and superovulation in cattle: recent advances and practical experience. *Arquivos de la Facultad Veterinaria (UFRGS, Porto Alegre)*; 24: 31-52.
34. Bo G. A., Caccia M., Martínez M., Mapletoft R. J. (1996c). Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. *Proceedings 13<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Sydney, Australia* 7: 22.
35. Bo G. A., Tribulo H., Caccia M., Tribulo R. (1998). Superovulatory response of beef heifers treated with estradiol benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*; 49: 375 (resumen).
36. Bo G. A., Mapletoft R. J. (1999). Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones. *Taurus* 4: 14-27.
37. Bo G. A. & Caccia M. (2002). Dinámica folicular en el bovino. En: *Reproducción en los Animales domésticos. Tomo I.* Ungerfeld R. (ed). Melibea Ediciones. Pp.: 55-68
38. Bo G. A., Baruselli P. S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Mapletoft R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*; 57: 53-72.
39. Bo G. A. & Mapletoft R. J. (2003). Superovulación en Bovinos, en Ungerfeld R (editor) *Reproducción en los Animales Domésticos - Tomo II*, Ediciones Melibea, Montevideo, Pp: 515-537.
40. Bodensteiner K. J., Wiltbank M. C., Bergfelt D. R., Ginther O. J. (1996a). Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*; 45: 499-512.
41. Bodensteiner K. J., Kot K., Wiltbank M. C., Ginther O. J. (1996b). Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology*; 45: 1115-1128.
42. Boland M. P., Goulding D., Roche J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*; 35: 5-17.
43. Bolt D. J., Scott V., Kiracofe G. H. (1990). Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim Reprod Sci*; 23: 263-271.



44. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*; 179: 77-79.
45. Brismar K., Fernqvist-Forbes E., Wahren J., Hall K. (1994). Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factorbinding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3 and IGF-1 in insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*; 79: 872-878.
46. Bungarts L., Niemann H. (1994). Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Rep Anim Fertil* 101: 583-591.
47. Burton J. H., MacLeod G. K., McBride B. W., Burton J. L., Bateman K., McMillan I., and Eggert R. G. (1990). Overall efficiency of chronically administered recombinant bovine somatotropin to lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 73: 2157.
48. Burton J. L., McBride B. W., Block E., Glimm D. R., Kennelly J. J. (1994). A review of bovine growth hormone. *Can J Anim Sci*; 74 (2): 167-201.
49. Caccia M. & Bo G. A. (1998a). Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*; 49: 341 (resumen).
50. Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Bo G. A. (1998b). Effect of different estrogen and progesterone treatments on superovulatory response in beef (*Bos taurus*) cattle. *Arquivos Facultad de Veterinaria UFRGS, Porto Alegre* 26 (suplemento): 211.
51. Caccia M., Tribulo R., Tribulo H. (2002). Superovulatory response of beef cows treated with progesterone devices and estradiol-17 $\beta$  or estradiol benzoate. *Theriogenology*; 57: 762 (resumen).
52. Callesen H., Greve T., Hyttell P. (1986). Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*; 25: 71-86.
53. Chandrashekar V., Zaczek D., Bartke A. (2004). The Consequences of Altered Somatotropic System on Reproduction. *Biology of Reproduction*; 71: 17-27.
54. Chang M. C. (1948). Transplantation of fertilized ova: The effect on viability of age, in vitro storage period, and storage temperature. *Nature (Lond)*; 161: 978.
55. Chupin D., Combarous Y., Procureur R. (1984). Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology*; 21: 229 (resumen).
56. Chupin D., Combarous Y., Procureur R. (1985). Different effect of LH on FSH-induced superovulation in two breeds of cattle. *Theriogenology*; 23: 184 (resumen).
57. Cole W. J., Franson S. E., Hoffman K. G., Meserole V. K., Sprick D. M., Madsen K. S., Hartnell G. F., Bauman D. E., Head H. H., Huber J. T., and Lamb R. C. (1989). Response of cows throughout lactation to somatotropin, recombinant methionyl bovine somatotropin, in a prolonged-release system-a dose titration study. Part 11. Health and reproduction. *J Dairy Sci*; 72: 451.
58. Cole W. J., Madsen K. S., Hintz R. L., and Collier R. J. (1991). Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. *Theriogenology*; 36: 573-595.
59. Cole W. J., Eppard, P. J. Boysen B. G., Madsen K. S., Sorbet R. H., Miller M. A., Hintz R. L., White T. C., Kibelin W. E., Hammond B. G., Collier K. J., and Lanza G. M. (1992). Response of dairy cows to high doses of a sustained-release bovine somatotropin administered during two lactations. 2. Health and reproduction. *J Dairy Sci*; 75: 111-123.

60. Collier R. J., Byatt J. C., Denham S. C., Eppard P. J., Fabellar A. C., Hintz R. L., McGrath M. F., McLaughlin C. L., Shearer J. K., Veenhuizen J. J. and Vicini. J. L. (2001). Effects of sustained release bovine somatotropin (sometribove) on animal health in commercial dairy herds. *J Dairy Sci*; 84: 1098-1108.
61. Critser J. K., Rowe R. F., Del Campo M. R., Ginther O J. (1980). Embryo transfer in cattle: factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos and length of post treatment estrous cycle. *Theriogenology*; 13: 397-406.
62. Dalton J. C. and Marcinkowski D. P. (1994). Effect of sometribove administration on LH concentrations in dairy cattle. *Theriogenology*; 41: 437.
63. Daughaday W. H. and Rotwein P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*; 10: 68.
64. de Bruin J. P. (2001). Development and Decline of the Human Ovarian Follicle Pool. PhD Thesis, Utrecht University.
65. de la Sota R. L., Lucy M. C., Staples R., and Thatcher W. W. (1993). Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 76: 1002-1013.
66. Deyo C. D., Colazo M. G., Martínez M. F., Mapletoft R. J. (2001). The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology*; 55: 513 (resumen).
67. Di Mauro S. M. Z., Furlan L. R., Ferro M. I. T., Macari M., Ferro J. A. (2002). Growth hormone mRNA expression in the pituitary of *Bos indicus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbred young bulls treated with recombinant bovine somatotropin. *Gen Mol Res*; 1 (4): 327-336.
68. Dieleman S. J., Bevers M. M., Gielen J. T. H. (1987). Increase of the number of ovulations in PMSG/PG treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*; 27: 222 (resumen).
69. Dieleman S. J., Bevers M. M., Vos P. L. A. M., De Loos F. A. M. (1993). PMSG/anti PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment?. *Theriogenology*; 39: 25-41.
70. Dowling D. F. (1949). Problems of the transplantation of fertilized ova. *J Agric Sci*; 39: 374-396.
71. Downer J. V., Patterson D. L., Rock D. W., Chalupa W. V., Cleale R. M., Firkins J. L., Lynch G. L., Clark J. H., Brodie B. O., Jenny B. F. and de Gregorio R. (1993). Dose titration of sustained-release recombinant bovine somatotropin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*; 76: 1125.
72. Echterkamp S. E., Spicer L. J., Gregory K. E., Canning S. F., Hammond J. M. (1990). Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol Reprod*; 43: 8-14.
73. Echterkamp S. E., Howard H. J., Roberts A. J., Grizzle J., Wise T. (1994). Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol Reprod*; 51: 971-981.
74. Elsdon R. P., Nelson L. D., Seidel G. E. Jr. (1978). Superovulation of cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*; 9: 17-26.

75. Eppard R. J., Hudson S., Cole W. J., Hintz R. L., Hartnell G. F., Hunter T. W., Metzger L. E., Torkelson A. R., Hammond B. G., Collier R. J. and Lanza G. M. (1991). Response of dairy cows to high doses of a sustained-release bovine somatotropin administered during two lactations. 1. Production response. *J Dairy Sci*; 74: 3807.
76. Eppard P. J., Veenhuizen J. J., Cole W. J., Comens-Keller P. G., Hartnell G. F., Hintz R. L., Munyai L., Olsson P. K., Sorbet R. H., White T. C., Baile C. A., Collier R. J., Goff J. P. and Horst R. L. (1996). Effect of Bovine Somatotropin Administered to Periparturient Dairy Cows on the Incidence of Metabolic Disease. *J Dairy Sci*; 79: 2170-2181.
77. Esteban E., Kass P. H., Weaver L. D., Rowe J. D., Holmberg C. A., Franti C. E., and Troutt H. F. (1994a). Pregnancy incidence in high producing dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*; 77: 468.
78. Esteban E., Kass P. H., Weaver L. D., Rowe J. D., Holmberg C. A., Franti C. E., and Troutt H. F. (1994b). Interval from calving to conception in high producing dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*; 77: 2549-2561.
79. Esteban E., Kass P. H., Weaver L. D., Rowe J. D., Holmberg C. A., Franti C. E., and Troutt H. F. (1994c). Reproductive performance in high producing dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*; 77: 3371-3381.
80. Evans A. C. O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim*; 38: 1-7.
81. Evans A. C. O., Ireland J. L. H., Winn M. E., Lonergan P., Smith G. W., Coussens P. M. and Ireland J. J. (2004a). Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod*; 70: First published online 21 Jan 2004; 10.1095/biolreprod.103.025114.
82. Evans A. C. O. and Canty M. J. (2004b). Physiology of follicle development in cattle. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada.
83. Fayad T., Levesque V., Sirois J., Silversides D. W. and Lussier J. G. (2004). Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod*; 70: 523-533.
84. Fortune J. E., Rivera G. M., Evans A. C. O. and Turzillo A. M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*; 65: 648-654.
85. Fuentes S., De la Fuente J. (2000). Holstein superovulatory responses in comercial dairy herís treated with estradiol-17 $\beta$  and progesterone on different days of intravaginal progestagen treatment. *Theriogenology*; 53: 497 (resumen).
86. Gallo G. F. and Block E. (1991). Effects of recombinant bovine somatotropin on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci*; 71: 343.
87. Galton D. M., Everett R. W., Van Amburg M. E., Bauman D. L., and Knoblauch W. A. (1997). Extended calving intervals with the use of bST. in *Proc. Western Large Herd Dairy Manage. Conf.*, Las Vegas, NV. USA. Pages: 116-121.
88. Gibbons J. R., Beyhan Z., Wiltbank M. C., Ginther O. J. (1996). Maintenance of selected bovine ovarian follicles. In. *Proceeding Midwest Section of American Society of Animal Science*; Des Moines, I. A. Pp: 182.

89. Ginther O. J., Kastelic J. P., Knopf L. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 87: 223-230.
90. Ginther O. J., Wiltbank M. C., Fricke P. M., Gibbons J. R. and Kot K. (1996a). Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol Reprod*; 55: 1187-1194.
91. Ginther O. J., Kot K., Kulick L. J., Martin S., Wiltbank M. C. (1996b). Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fert*; 108: 271 - 279.
92. Ginther O. J., Beg M. A., Donadeu F. X. and Bergfelt D. R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci*; 78: 239-257.
93. Giudice L. C. (1992). Insulin-Like Growth Factors and Ovarian Follicular Development. *Endocrine Reviews*; 13 (4): 641-669.
94. Glistler C., Tannetta D. S., Groome N. P. and Knight P. G. (2001). Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod*; 65: 1020-1028.
95. Gluckman, P. D., Breier B. H., and Davis S. R. (1987). Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. *J Dairy Sci*; 70: 442.
96. Goff J. P., Caperna T. J., and Steele N. C. (1990). Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest Anim Endocrinol*; 7: 425.
97. Gong J. G., Bramly T., Webb R. (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod*; 45: 941-949.
98. Gong J. G., Bramly T. A., Wilmut I., Webb R. (1993). Effect of Recombinant Bovine Somatotropin on the Superovulatory Response to Pregnant Mare Serum Gonadotropin in Heifers. *Biol Reprod*; 48: 1141-1149.
99. Gong J. G., Wilmut I., Bramly T. A. and Webb R. (1996). Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*; 45: 611-622.
100. Gong J. G., Baxter G., Bramly T. A. and Webb R. (1997). Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: A dose response study. *J Reprod. Fert*; 110: 91-97.
101. González A., Lussier J. G., Carruthers T. D., Murphy B. D., Mapletoft R. J. (1990). Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*; 33: 519.
102. González A., Wang H., Carruthers T. D., Murphy B. D., Mapletoft R. J. (1994a). Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*; 41: 1631-1642.
103. González A., Wang H., Carruthers T. D., Murphy B. D., Mapletoft R. J. (1994b). Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can Vet J* 35: 158-162.
104. Good T. E. M., Weber P. S. D., Ireland J. L. H., Pulaski J., Padmanabhan V., Schneyer A. L., Lambert-Messerlian G., Ghosh B. R., Miller W. L., Groome N. and Ireland J. J. (1995). Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod*; 53: 1478-1488.

105. Gordon I. (1982). Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In: Adams C. E. (ed.), *Mammalian Egg Transfer*. Boca Raton, FL: CRC. Press 63-80.
106. Greve T., Callesen H., Hyttel P. (1983). Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nordic Veterinary Medicine* 35: 408-421.
107. Greve T., Callesen H., Hyttel P. (1984). Characterization of plasma LH-profiles in superovulated dairy cows. *Theriogenology*; 21: 327.
108. Grimard B., Humblot P., Ponter A. A., Mialot J. R., Sauvant D., Thibier M. (1995). Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil*; 104: 173-179.
109. Hahn J. (1992). Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*; 38: 269-275.
110. Hartnell G. F., Franson S. E., Bauman D. E., Head H. H., Huber J. T., Lamb R. C., Madsen K. S., Cole W. J., and Hintz R. L. (1991). Evaluation of sometribove in a prolonged-release system in lactating dairy cows-production responses. *J Dairy Sci*; 74: 2645-2663.
111. Hasler J. F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*; 79 (3 - 4): 245-264.
112. Hasler J. F., Bilby C. R., Collier R. J., Denham S. C., Lucy M. C. (2003). Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*; 59 (9): 1919-1928.
113. Heape W. (1890). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc R Soc Lond*; 48: 113-120.
114. Hemken R. W., Harmon R. J., Silvia W. J., Tucker W. B., Heersche G. and Eggert R. G. (1991). Effects of dietary energy and previous bovine somatotropin on milk yield mastitis and reproduction in dairy cows. *J Dairy Sci*; 74: 4265.
115. Hill B. R., Kuehner L. F. (1996). Follicle aspiration prior to superovulation in cattle. *Theriogenology*; 43: 324 (resumen).
116. Hirshfield A. N. (1991). Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol of Reprod*; 44: 1157-1162.
117. Hoblet K. H., Schnitkey G. D., Arbaugh D., Hogan J. S., Smith K. L., Schoenberger P. S., Todhunter D. A., Hueston W. D., Pritchard D. E., Bowman G. L., Heider L. E., Brockett B. L. and Conrad H. R. (1991). Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *JAVMA*; 199: 190.
118. Hockley D. K., Bo G. A., Palasz A. T., Del Campo M. R., Mapletoft R. J. (1992). Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*; 37: 224 (resumen).
119. Holly J. M. P., Biddlecombe R. A., Dunger D. B., Edge J. A., Amiel S. A., Howell R., Chard T., Rees L. H., Wass J. A. H. (1988). Circadian variation of growth hormone-independent insulin-like growth factor binding protein in diabetes mellitus and its relationship to insulin. A new role for insulin. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 29: 667.
120. Huhtinen M., Raino V., Aalto J., Bredbacka P. (1992). Increased ovarian responses in the absence of the dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*; 37: 457-463.

121. Hull K. L. and Harvey S. (2001). Growth hormone: Roles in female reproduction. *J. Endocrinol*; 168: 1-23.
122. Hynes M. A., Van Wyk J. J., Brooks P. J., D'Ercole A. J., Jansen J., Lund P. K. (1987). Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol*; 1: 233.
123. Johnson A. L. (2003). Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*; 78: 185-201.
124. Judge L. J., Erskine R. J., Bartlett P. C. (1997) Recombinant Bovine Somatotropin and Clinical Mastitis: Incidence, Discarded Milk Following Therapy, and Culling. *J Dairy Sci*; 80:3212–3218.
125. Judge L. J., Bartlett P. C., Lloyd J. W., Erskine R. J. (1999). Recombinant bovine somatotropin: association with reproductive performance in dairy cows. *Theriogenology*; 52 (3): 481-496.
126. Kaneko H., Nakanishi Y., Akagi S., Arai K., Taya K., Watanabe G., Sasamoto S., Hasegawa Y. (1995). Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows. *Biol Reprod*; 53: 931-939.
127. Kanitz W., Becker F., Schneider F., Kanitz E., Leiding C., Nohner H., Pöhland R. (2002). Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev*; 42: 587-599.
128. Kastelic J. P., Ko J. C. H., Ginther O. J. (1990). Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology*; 34: 499-509.
129. Kawamata M. (1994). Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet Med Sci*; 56 (5): 965-967.
130. Kim H. I., Son D. S., Yeon H., Choi S. H., Park S. B., Ryu I. S., Suh G. H., Lee D. W., Lee C. S., Lee H. J., Yoon J. Y. (2001). Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*; 37: 937-945.
131. Kirby C. J., Smith M. F., Keisler D. H., and Lucy M. C. (1997a). Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained release bovine somatotropin. *J Dairy Sci*; 80: 273-285.
132. Kirby, C. J., Wilson S. J., and Lucy M. C. (1997b). Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F<sub>2</sub>α. *J Dairy Sci*; 80: 286-294.
133. Knight P. G. and Glister C. (2003). Local roles of TGF-β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*; 78: 165-183.
134. Ko J. C. H., Kastelic J. P., del Campo M. R., Ginther O. J. (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil*; 91: 511-519.
135. Kronfeld D. S. (1994). Health management of dairy herds treated with bovine somatotropin. *JAVMA*; 204: 116.
136. Kuehner, L. F., Rieger D., Walton J. S., Zhao X., and Johnson W. H. (1993). The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*; 40: 1003-1013.

137. Laster D. B. (1972). Disappearance of and uptake of (<sup>125</sup>I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil*; 30: 407-415.
138. Law A. S., Baxter G., Logue D. N., O'Shea T., Webb R. (1992). Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. *J Reprod Fertil*; 96: 603-616.
139. Lean I. J., Troutt H. F., Bruss M. L., Farver T. B., Baldwin, K. L. Galland J. C., Kratzer D., Holmberg C. A., and Weaver L. D. (1991). Postparturient metabolic and production responses in cows previously exposed to long-term treatment with somatotropin. *J Dairy Sci*; 74: 3429.
140. Lee P. D. K., Jensen M. D., Divertie G. D., Heiling V. J., Katz H. H., Conover C. A. (1993). Insulin-like growth factor-binding protein-1 response to insulin during suppression of endogenous insulin secretion. *Metabolism*; 42: 409-414.
141. Lee P. D. K., Giudice L. C., Conover C. A., Powell D. R. (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc Soc Exp Biol Med*; 216: 319-357.
142. Lewis I. M., Trounson A. O. (1996). Superovulation in cattle: chemical ablation of the dominant follicle using estradiol-17 $\beta$ . *Singapore Journal of Obstetrics and Gynaecology*; 27: 63-65.
143. Lindsell C. E., Murphy B. D., Mapletoft R. J. (1986a). Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*; 26: 209-219.
144. Lindsell C. E., Rajkumar K., Manning A. W., Emery S. K., Mapletoft R. J., Murphy B. D. (1986b). Variability in FSH: LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*; 25: 167.
145. Littledike E. T., Young J. W., and Beitz D. C. (1981). Common metabolic diseases in cattle: ketosis, milk fever, grass tetany, and downer cow complex. *J Dairy Sci*; 64: 1465.
146. Looney C. R. (1986). Superovulation in beef females. *Proceedings of 5<sup>th</sup> Annual Convention AETA, Fort Worth, TX, EE.UU. Pp.*: 16-29.
147. Looney C. R., Bondioli K. R., Hill K. G., Massey J. M. (1988). Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*; 29: 271.
148. Lucy, M. C., Collier R. J., Kitchell M. L., Dibner J. J., Hauser S. D., and Krivi G. G. (1993a). Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod*; 48: 1219.
149. Lucy, M. C., de la Sota R. L., Staples C. R., and Thatcher W. W. (1993b). Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J Dairy Sci*; 76: 1014.
150. Lucy M. C., Curran T. L., Collier R. J., and Cole W. J. (1994). Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology*; 41: 561-572.
151. Lucy, M. C., Thatcher W. W., Collier R. J., Simmen F. A., Ko Y., Savio J. D., and Badinga L. (1995). Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol*; 12: 73.

152. Lucy M. C., Boyd C. K., Koenigfeld A. T., and Okamura C. S. (1998). Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J Dairy Sci*; 81: 1889-1895.
153. Lucy, M. C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*; 83: 1635-1647.
154. Luna-Dominguez J. E., Enns R. M., Armstrong D. V. and Ax R. L. (2000). Reproductive Performance of Holstein Cows Receiving Somatotropin *J Dairy Sci*; 83: 1451-1455.
155. Lundy T., Smith P., O'Connell A., Hudson N. L. and McNatty K. P. (1999). Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fert*; 115: 251-262.
156. Macmillan K. L., Thatcher W. W. (1991). Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol of Reprod*; 45: 883-889.
157. Mann G. E. and Lamming G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reprod*; 121: 175-180
158. Mapletoft R. J., Pawlyshyn V., García A., Bo G. A., Willmott N., Saunders J., Schmutz S. (1990). Comparison of four different gonadotropin treatments for inducing superovulation in cows with 1:29 traslocation. *Theriogenology*; 33: 282 (resumen).
159. Mapletoft R. J., Bo G. A., Murphy B. D. (1991). The effect of biological activity of gonadotropins on superovulations in the cows. *Proceedomgs IX Congreso Brasileiro de Reprodução Animal*; 1: 74-92.
160. Mapletoft R. J., Martínez M. F., Adams G. P., Kastelic J., Burnley C. A. (1999). The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology*; 51: 411 (resumen).
161. Mapletoft R. J., Bo G. A., Adams G. P. (2000). Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo tranfer programs. *Arquivos de la Facultad de Veterinaria (UFRGS, Porto Alegre)* 28: 23-48.
162. Mapletoft R. J., Steward K. B., Adams G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*; 42 (6): 601-611.
163. Mapletoft R. J., Hasler J. F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech*; 24 (1): 393-403.
164. Martínez M. F., Adams G. P., Bergfelt D., Kastelic J. P., Mapletoft R. J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci*; 57: 23-33.
165. Martins C. M., Marques M. O., Silva R. C. P., Baruselli P. S. (2005). Adequaçã do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. Tese de mestrado.
166. Mather J. P., Woodruff T. K. and Krummen L. A. (1992). Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proceedings of the Society for Experimental Biol and Med*; 201: 1-15.
167. McGowan M. R. Braithwaite M., Jochle W., Mapletoft R. J. (1985). Superovulation of beef cattle with Pergonal (hMG): A dose response trial. *Theriogenology*; 24: 173-184.
168. McNatty K. P., Heath D. A., Henderson K. M., Lun S., Hurst P. R., Ellis L. M., Montgomery G. W., Morrison L., Thurley D. C. (1984). Some aspects of thecal and



- granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*; 72: 39-53.
169. Merriman H. L., La Tour D., Linkhart T. A., Mohan S., Baylink D. J., Strong D. D. (1990). Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce *c-fos* in mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Ints*; 46: 258.
  170. Meyer J. A., Wideman D., Looney C. R., Long C. R., Bo G. A., Day M. L., Anderson J. C., Forrest D. W. (2000). Embryo production rates of cattle superovulated with and without the presence of an intravaginal progesterone releasing device. *Theriogenology*; 53: 504 (resumen).
  171. Mihm M. and Bleach E. C. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*; 78: 217-237.
  172. Mikel-Jenson A., Greve T., Madej A., Edqvist L. E. (1982). Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG/PGF treated cow. *Theriogenology*; 18: 33-34.
  173. Miller G. Y., Bartlett P. C., Lance S. E., Anderson J. D. and Heider L. E. (1993). Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *JAVMA*; 202: 1230.
  174. Mohan S., Bautista C. M., Wergedal J., Baylink D. J. (1989). Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 8338.
  175. Monniaux D., Chupin D., Saumande J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*; 19: 55-81.
  176. Moor R. M., Kruip T. A. M., Green D. (1984). Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? *Theriogenology*; 21: 103-116.
  177. Morales-Roura J. S., Zarco L., Hernández-Ceron J. and Rodríguez G. (2001). Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat breeding dairy cows. *Theriogenology*; 55:1831-1841.
  178. Morbeck D. E., Britt J. H., and McDaniel B. T. (1991). Relationships among milk yield, metabolism, and reproductive performance of primiparous Holstein cows treated with somatotropin. *J Dairy Sci*; 74: 2153-2164.
  179. Moreira F., Risco C. A., Pires M. F., Ambrose J. D., Drost M., and Thatcher W. W. (2000). Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci*; 83: 1237-1247.
  180. Moreira F., Orlandi C., Risco C. A., Mattos R., Lopes F., and Thatcher W. W. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 84: 1646-1659.
  181. Moreira F., Badinga L., Burnley C., and Thatcher W. W. (2002a). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*; 57: 1371-1387.
  182. Moreira F., Paula-Lopes F. F., Hansen P. J., Badinga L., and Thatcher W. W. (2002b). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*; 57: 895-907.
  183. Moreno D., Cutaia L., Villata M. L., Ortisi F., Bo G. A. (2001). Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*; 55: 408 (resumen).

184. Motulsky H. (1995). *Intuitive Biostatistics*. GraphPad Software. Cap. 37. Choosing a Test. Oxford University Press. New York.
185. Murphy B. D., Mapletoft R. J., Manns J., Humphrey W. D. (1984). Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*; 21: 117-125.
186. Murphy B. D., Martinuk D. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*; 12: 27-44.
187. Murphy L. J., Murphy L. C., Friesen H. G. (1987). Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol*; 1: 445.
188. Murphy L. J., Friesen H. G. (1988). Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology*; 122: 325.
189. Murphy M. G., Rath M., Ocallaghan D., Austin F. H., Roche J. F. (1991a). Effect of Bovine Somatotropin on production and reproduction in prepubertal friesian heifers. *J Dairy Sci*; 74: 2165-2171.
190. Murphy M. G., Enright W. J., Crowe M. A., Mc Connell K., Spicer L. J., Boland M. P., Roche J. F. (1991b). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil*; 92: 333-338.
191. Nasser L. F., Adams G. P., Bo G. A., Mapletoft R. J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*; 40: 713-724.
192. Nasser L. F., Bo G. A., Reis E. L., Menegatti J. A., Marques M. O., Mapletoft R. J., Baruselli P. S. (2003). Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*; enviado.
193. Nicholas J. S. (1933). Development of transplanted rat eggs. *Proc Soc Exp Biol Med*; 30: 1111-1113.
194. Nigro M., Burry E., Bo G. A. (1996a). Respuestas superovulatorias utilizando el tratamiento de CIDR-B y estradiol 17- $\beta$  en programas comerciales de transferencia de embriones. 2<sup>do</sup>. Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba. Pp.: 268.
195. Nigro M., Burry E., Mapletoft R. J., Bo G. A. (1996b). Respuestas superovulatorias en vacas lecheras tratadas con Lutropin-V en la primera inseminación. 2<sup>do</sup>. Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba.
196. Nigro M., Burry E., Caccia M., Bo G. A. (1999). Respuestas superovulatorias en vacas lecheras tratadas con Lutropin-V en la primera inseminación. 3<sup>er</sup>. Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba. Pp.: 220.
197. Nigro M., Burry E., Villata M. L., Bo G. A. (2002). Effect of different estrogen and progesterone treatments on superovulatory response in beef and dairy cattle. *Theriogenology*; 57: 769 (resumen).
198. Nogueira M. F. G., Barros B. J. P., Teixeira A. B., Trinca L. A., D'Occhio M. J., Barros C. M. (2002). Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*; 57: 1625-1634.
199. Oldenbroek J. K., Garssen G. J., Jonker L. J., and Wilkinson J. I. (1993). Effects of treatment of dairy cows with recombinant bovine somatotropin over three or four lactations. *J Dairy Sci*; 76: 453.

200. Oltenacu P. A. and Ekesbo I. (1994). Epidemiological study of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet Res*; 25: 208.
201. Ong J., Yamashita S., Melmed S. (1987). Insulin-like growth factor I induces *c-fos* messenger ribonucleic acid in Lb rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*; 120: 353.
202. Orskov H., Wolthers T., Grofte T., Flyvbjerg A., Vilstrup H., Hamberg O. (1994). Somatostatin-stimulated insulin-like growth factor binding protein-1 release is abolished by hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*; 78: 138-140.
203. Padmanabhan V. and McNeilly A. S. (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reprod*; 121: 21-30.
204. Page R. D., Jordan J. E., Johnson S. K. (1989). Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. *Theriogenology*; 31: 236 (resumen).
205. Pao C. I., Farmer P. K., Begovic S., Villafuerte B. C., Wu G., Robertson D. G., Phillips L. S. (1993). Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein I gene transcription by hormones and provision of amino acids in rat hepatocytes. *Mol Endocrinol*; 7: 1561-1568.
206. Parrott J. A. and Skinner M. K. (2000). Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effect on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod and Dev*; 55: 55-64.
207. Peel C. J. and Bauman D. E. (1987). Somatotropin and lactation. *J Dairy Sci*; 70: 474.
208. Pell A. N., Tsang D. S., Howlett B. A., Huyler M. T., Meserole V. K., Samuels W. A., Hartnell G. F. and Hintz R. L. (1992). Effects of prolonged-release formulation of sometribove (n-methionyl bovine somatotropin) on Jersey cows. *J Dairy Sci*; 75: 3416.
209. Perkel V. S., Mohan S., Baylink D. J., Linkhart T. A. (1990). An inhibitory insulin-like growth factor binding protein (In-IGFBP) from human prostatic cell conditioned medium reveals N-terminal sequence identity with bone derived In-IGFBP. *J Clin Endocrinol Metab*; 71: 533.
210. Pincus G., Enzmann E. V. (1934). Can mammalian eggs undergo normal development in viro? *Proc Natl Acad Sci; U.S.A.* 20: 121.
211. Poretsky L., Cataldo N. A., Rosenwaks Z., and Giudice L. C. (1999). The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease. *Endocrine Reviews*; 20 (4): 535-582.
212. Price C. A. (1991). Induction of multiple ovulation in farm species: successes and heroic failures. *Agric Biotechnol News*; 3: 33-38.
213. Pursley J. R., Mee M. O., Wiltbank M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> and GnRH. *Theriogenology*; 44: 915-923.
214. Rechler M. M., Nissley S. P. (1990). Insulin-like growth factors. In: Sporn M. B., Roberts A. B. (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. Springer-Verlag, Berlin, 95: 263.
215. Remond B., Cisse M., Ollier A., and Chilliard Y. (1991). Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate. 1. Performance and body condition. *J Dairy Sci*; 74: 1370.
216. Rhodes J. M., De'Ath G., Entwistle K. W. (1995). Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci*; 38: 265-277.

217. Rieger D., Desaulniers D., Goff A. K. (1988). Ovulatory responses and embryo yield in superovulated Holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. *Theriogenology*; 30: 695-699.
218. Rijpkema Y. S., van Reeuwijk L. and Hard D. L. (1990). Responses of dairy cows to treatment with sometribove (r-BST) during three consecutive years. *Livest Prod Sci*; 26: 193.
219. Rinderknecht E., Humbel R. E. (1978a). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*; 253: 2.769.
220. Rinderknecht E., Humbel R. E. (1978b). The primary structure of human insulin-like growth factor-II. *FEBS Lett*; 89: 283.
221. Rivera G. M. and Fortune J. E. (2003). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*; 144: 2977-2987.
222. Rivier J., Spiess J., Thorner M., Vale W. (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature*; 300: 276-278.
223. Roberts C. T., Brown A. L., Graham D. E., Seelig S., Berry S., Gabbay K. H., Rechler M. M. (1986). Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver. *J Biol Chem*; 261: 10.025.
224. Roth Z., Arav A., Braw-Tal R., Bor A. and Wolfenson D. (2002). Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *J Dairy Sci*; 85: 1398-1405.
225. Santos J. E. P., Juchem S. O., Cerri R. L. A., Galvão K. N., Chebel R. C., Thatcher W. W., Dei C. S., and Bilby C. R. (2004). Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*; 87: 868-881.
226. Santos J. E. P., Thatcher W. W., Pool L. and Overton M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high producing lactating holstein dairy cows. *J Anim Sci*; 79: 2881-2894.
227. Sauerwein H., Miyamoto A., Gunther J., Meyer H. H. D., Schams D. (1992). Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*; 96: 103.
228. Saumande J. (1980). Concentration of luteinizing hormone, oestradiol 17 $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J Endo*; 84: 425-437.
229. Schallenberger E., Rampp J., Walters D. L. (1985). Gonadotropins and ovarian steroids in cattle 11. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout pregnancy. *Acta Endocrinol*; 108: 322-330.
230. Schemm S. R., Deaver D. R., Griel Jr. L. C. and Muller L. D. (1990). Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol Reprod*; 42: 815.
231. Singh A., Hamilton-Fairley D., Koistinen R., Seppala M., James V. H. T., Franks S., Reed M. J. (1990). Effect of insulin-like growth factortype I (IGF-I) and insulin on the secretion of sex hormone binding globulin and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) by human hepatoma cells. *J Endocrinol*; 124: R1-R3.

232. Sisco B., Hagemann L. J., Shelling A. N. and Pfeffer P. L. (2003). Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology*; 144: 3904-3913.
233. Skarda J., Markalous E., Slaba J., Krejci P., Skardova O., and Zednik J. (1992). Effect of methionyl bovine somatotropin in a prolonged-release vehicle on milk production, hormone profiles and health in dairy cattle. *J. Dairy Res*; 59: 499.
234. Smitz J. E. J. & Cortvrintd R. G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reprod*; 123: 185-202.
235. Spicer L. J., Echternkamp S. E., Canning S. F., Hammond J. M. (1988). Relationship between concentrations of immunoreactive insulinlike growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol Reprod*; 39: 573-580.
236. Spicer L. J., Enright W. J. (1991). Concentrations of insulin-like growth factor I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog and(or) thyrotropin-releasing hormone. *J Anim Sci*; 69: 1133-1139.
237. Spicer L. J., Alpizar E., Echemkamp S. E. (1993). Effects of insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production *in vitro*. *J Anim Sci*; 71: 1232-1241.
238. Spicer L. J., Echternkamp S. E. (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*; 12: 223-245.
239. Stanisiewski E. P., Krabill L. F., and Lauderdale J. W. (1992). Milk yield, health, and reproduction in dairy cows given somatotropin (Somavubove) beginning early postpartum. *J. Dairy Sci*; 75: 2149.
240. Stevenson J. S., Schmidt M. K., and Coll E. P. (1983). Factors affecting reproductive performance of dairy cows first inseminated after five weeks postpartum. *J. Dairy Sci*; 66: 1148-154.
241. Suikkari A. M., Koivisto V. A., Rutanen E. M., Yki-Jarvinen H., Karonen S. L., Seppala M. (1988). Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*; 66: 266-272.
242. Suikkari A. M., Koivisto V. A., Koistinen R., Seppala M., Yki-Jarvinen H. (1989). Dose-response characteristics for suppression of low molecular weight plasma insulin-like growth factor-binding protein by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*; 68:135.
243. Thibier M. (1999). The 1998 Statistical Figures for the Worldwide Embryo Transfer. Industry: A Boom for Bovine Embryo Transfer in the Two Americas?. A Data Retrieval Committee Report; Pp.: 25-31.
244. Thibier M. (2004). Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. Data Retrieval Committee Annual Report. Embryo Transfer Newslette; Pp.: 12-19.
245. Thomas J. W., Erdman R. A., Galton D. M., Lamb R. C., Arambel M. J., Olson J. D., Madsen K. S., Samuels W. A., Peel C. J., and Green G. A. (1991). Responses by lactating cows in commercial dairy herds to recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci*; 74: 945.

246. Tribulo H., Bo G. A., Jofre F., Carcedo J., Alonso A., Mapletoft R. J. (1991). The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*; 35: 286 (resumen).
247. Turzillo A. M., Fortune J. E. (1993). Effect of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J Reprod Fertil*; 98: 113-119.
248. Van Wezel I. L., Umapathysivain K., Tilley W. D. and Rodgers R. J. (1995). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol and Cell Endo*; 115: 133-140.
249. Van Wezel I. L. and Rodgers R. J. (1996). Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol of Reprod*; 55: 1003-1011.
250. Whitaker D. A., Smith E. J., Kelly J. M., and Hodgson-Jones L. S. (1988). Health, welfare and fertility implications of the use of bovine somatotropin in dairy cattle. *Vet. Rec*; 122: 503.
251. White T. C., Madsen K. S., Hintz R. L., Sorbet R. H., Collier R. J., Hard D. L., Hartnell G. F., Samuels W. A., de Kerchove G., Adriaens F., Craven N., Bauman D. E., Bertrand G., Bruneau P., Gravert G. O., Head H. H., Huber J. T., Lamb R. C., Palmer C., Pell A. N., Phipps R., Weller R., Piva G., Rijpkema Y., Skarda J., Vedeau F., and Wollny C. (1994). Clinical mastitis in cows treated with sometribove (recombinant bovine somatotropin) and its relationship to milk yield. *J. Dairy Sci*; 77: 2249.
252. Willet F. L. et al. (1951). Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*; 113: 247.
253. Willmott N., Saunders J., Bo G. A., Palasz A., Pierson R. A., Mapletoft R. J. (1990). The effect of FSH/LH ratios in pituitary extracts on superovulatory response in the cows. *Theriogenology*; 33: 347 (resumen).
254. Wilson J. M., Moore K., Jones A. L., Looney C. R. (1989). Recombinant bovine follicle-stimulating hormone: dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*; 31: 273 (resumen).
255. Wiltbank J. N., Zimmerman D. R., Ingalls J. E., Rowden W. W. (1965). Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *J Anim Sci*; 24: 990-994.
256. Wingfield P. T., Graber P., Buell G., Rose K., Simq U. G. and Burleigh B. D. (1987). Repatation and chamterhtion of bovine growth hornones produced in recombinant *Escherichia coli*. *Biochem J*; 243 (3): 829.
257. Wood S. C., Glencross R. G., Bleach E. C. L., Lovell R., Bearch A. J., Knight P. G. (1993). The Ability of steroid-free bovine follicular fluid to suppress FSH secretion and delay ovulation persists in heifers actively immunized against inhibin. *J Endocrinol*; 136: 137-148.
258. Wuster C. (1993). Growth hormone and bone metabolism. *Acta Endocrinol*; 128: 14.
259. Xu Z., Garverick H. A., Smith G. W., Smith M. F., Hamilton S. A., Youngquist R. S. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*; 53: 951-957.

- 260.** Yaakub H., O'Callaghan D., Boland M. P. (1999). Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*; 51 (7): 1259-1266.
- 261.** Yuan W., Bao B., Garverick H. A., Youngquist R. S., Lucy M. C. (1998). Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest Anim Endocrinol*; 15: 55-63.
- 262.** Zhao X., Burton J. H., and McBride B. W. (1992). Lactation, health, and reproduction of dairy cows receiving daily injections of sustained-release somatotropin. *J. Dairy Sci*; 75: 3122.

## 9) ANEXO

### Anexo I – Resultados del ensayo tabulados

GRUPO	DONANTE	TORO	CL	ESTR. TOTALES	INFERTILES	DEGENERADOS	EMB. VIABLES
bST	SA1000	GRANDSLAM	13	13	13	0	0
bST	SA1026	BAZOOKA	9	5	4	0	1
bST	SA1028	GRANDSLAM	10	3	0	1	2
bST	SA1583	LEADER	15	22	3	7	12
bST	SA284	GRANDSLAM	19	18	13	0	5
bST	SA1023	MASCOT	14	19	2	2	15
bST	SA1263	GRANDSLAM	10	12	2	0	10
bST	SA1468	B-DREW	12	17	0	0	17
bST	SA961	JUROR	5	5	4	0	1
bST	SA1095	MARDI GRASS	0	0	0	0	0
bST	SA1097	TESKBEST	18	14	10	2	2
bST	SA1311	GRANDSLAM	7	5	0	2	3
bST	SA208	GRANDSLAM	2	1	1	0	0
bST	SA460	MASCOT	9	13	13	0	0
bST	SA591	BAZOOKA	4	0	0	0	0
bST	SA2069	BUCKEYE	15	13	1	4	8
bST	SA2610	SAMUEL	10	9	4	1	4
bST	SA3125	MR.SAM	4	4	3	0	1
bST	SA2346	ROY	15	14	13	0	1
bST	SA3732	BUCKEYE	15	12	6	0	6
bST	SA3318	TERRASON	10	27	5	0	22
bST	SA2437	SEPTEMBER STORM	13	9	5	2	2
bST	SA3746	OUTSIDE	6	7	3	3	1
bST	SA3472	BUCKEYE	2	2	0	2	0
bST	SA2871	BUCKEYE	5	5	0	1	4
Control	SA1093	COUSTEAU	7	6	2	1	3
Control	SA1141	LHEROS	0	0	0	0	0
Control	SA2375	CONTROL	7	7	5	0	2
Control	SA3032	GIBSON	15	2	1	0	1
Control	SA1264	IGNITER	7	2	1	0	1
Control	SA2418	ROY	20	18	19	0	0
Control	SA464	STORMATIC	20	16	5	1	10
Control	SA2026	ALLEN	10	10	10	0	0
Control	SA2561	IGNITER	10	8	0	0	8
Control	SA2119	LHEROS	3	2	0	0	2
Control	SA2382	LHEROS	20	24	9	2	13
Control	SA3632	GIBSON	6	7	1	0	6
Control	SA2099	GIBSON	5	4	0	1	3
Control	SA2850	ROY	3	3	3	0	0
Control	SA2382	LHEROS	13	9	0	0	9
Control	SA2795	STORMATIC	13	14	1	1	12
Control	SA3632	GIBSON	0	0	0	0	0
Control	SA2382	ROY	12	15	7	1	7
Control	SA3500	ALLEN	0	0	0	0	0
Control	SA2495	MORTY	12	7	0	0	7
Control	SA2610	GIBSON	10	14	8	0	6
Control	SA3582	LHEROS	15	20	1	1	18
Control	SA3079	STORMATIC	18	14	0	3	11
Control	SA3683	DUNDEE	8	4	3	0	1
Control	SA3378	LHEROS	20	17	7	2	8
Control	SA2382	OUTSIDE	15	15	3	0	12
Control	SA3577	ALLEN	5	1	0	0	1
Control	SA2739	STORMATIC	3	7	1	0	6