

AVANCES EN LOS PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN DE DONADORAS DE EMBRIONES BOVINOS

Advances in synchronization and superovulation protocols from donor bovine embryo

Gabriel A. Bó^{1,2}, Andrés Vera Cedeño^{1,4}, José Luis Barajas Merchán¹, Andrés Tibulo¹, Reuben J. Mapletto³

¹ Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural, General Paz (5145), Córdoba, Argentina.

² Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina.

³ Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada, S7N 5B4.

⁴ Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM), Facultad de Medicina Veterinaria, Calceta, Bolívar, Manabí, Ecuador.

* Corresponding author
Gabriel Bó
E-mail: gabrielbo62@gmail.com

ABSTRACT

Despite the fact that research efforts in recent years have led to little or no increase in the number of transferable embryos after superovulation, the protocols that control the emergence of the follicular wave (Bo et al., 1995; 2002) and the time of ovulation (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006) have allowed the treatment of groups of donors, whatever the stage of the estrous cycle in which they were and has allowed artificial insemination and the transfer of fixed-time embryos (FTAI and FTET, respectively), without the need to detect estrus. The purpose of this work is to review the attempts made for alternative treatments that improve the super-stimulatory response and the simplification of the superovulation protocols in cattle.

Keywords: Synchronization, superovulation, bovine, embryo

RESUMEN

A pesar de que los esfuerzos de investigación en los últimos años han dado lugar a poco o ningún aumento en el número de embriones transferibles después de la superovulación, los protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular (Bo et al., 1995; 2002) y el momento de la ovulación (Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006) han permitido el tratamiento de grupos de donantes, sea cual fuere la etapa del ciclo estral en que se encontraban y ha permitido la inseminación artificial y la transferencia de embriones a tiempo fijo (IATF y TETF, respectivamente), sin necesidad de detectar celo. El propósito de este trabajo es revisar los intentos realizados alternativas de tratamientos que mejoren la respuesta superestimuladora y la simplificación de los protocolos de superovulación en bovinos.

Palabras clave: Sincronización, superovulación, bovino, embrión.

INTRODUCCION

Tratamientos de superovulación para la producción de embriones in vivo

Tradicionalmente, los tratamientos de gonadotropina se iniciaban durante la fase luteal media, de aproximadamente 9 a 11 días después del celo (revisado en Bó et al., 1995; Mapletoft et al., 2002), cercano al tiempo de emergencia de la segunda onda folicular (Ginther et al., 1989). Sin embargo, se produjo una mayor respuesta superovulatoria cuando se iniciaron los tratamientos en el día de la emergencia de la onda folicular, en contraposición a 1 día antes, ó 1 ó 2 días después de la emergencia de la onda (Nasser et al., 1993). Por lo tanto, los protocolos de superovulación tradicionales tienen dos inconvenientes: 1) el requisito de disponer de personal capacitado dedicado a la detección de celo, y 2) la necesidad de tener todos los donantes en estro al mismo tiempo con el fin de iniciar los tratamientos en los grupos de animales. Recientemente hemos resumido los protocolos de superovulación actuales para el ganado bovino (Bó y Mapletoft, 2014; Bó et al., 2018).

Sincronización de la emergencia de la onda folicular para inducir la superovulación

En la década de 1990, se informó acerca de la sincronización de la emergencia de la onda folicular, en promedio 4 días después del tratamiento con progesterona y estradiol (Bó et al., 1995). Este tratamiento ha sido utilizado por los profesionales de todo el mundo para la superovulación del ganado bovino, pero su uso ahora ha sido restringido en varios países. Esta restricción hace que muchos profesionales de transferencia de embriones se enfrenten a un serio dilema y ha creado la necesidad de desarrollar tratamientos sin el uso de estradiol. Una alternativa es eliminar el efecto supresor del folículo dominante por aspiración del folículo guiada por ecografía e iniciar tratamientos superestimuladores 1 o 2 días más tarde (Bergfelt et al., 1997). La desventaja de la aspiración folicular guiada por ecografía es que requiere un equipo de ultrasonido y personal capacitado, por lo que únicamente es apropiada cuando las donantes se encuentran en instalaciones de producción de embriones, es muy difícil de aplicar en el campo. Sin embargo, permitiría utilizar la aspiración folicular para la producción in vitro de embriones y luego comenzar la superovulación para la producción in vivo de embriones dos días después.

Otra alternativa es el uso de la GnRH para inducir la ovulación del folículo dominante que sería seguido por emergencia de la onda folicular 1 a 2 días más tarde (Martínez et al., 1999). Sin embargo, la aparición de una nueva onda folicular se sincronizó solamente cuando el tratamiento causó la ovulación, y sin pre-sincronización, la primera aplicación de GnRH provoca la ovulación en menos del 60% de los animales (Martínez et al., 1999; Small et al., 2009). No es sorprendente que el tratamiento con GnRH en momentos al azar del ciclo estral, antes de iniciar tratamientos superestimuladores, dio lugar a respuestas superovulatorias más bajas que los tratamientos iniciados después de la aspiración folicular o tratamiento con estradiol (Deyo et al., 2001). Sin embargo, en un análisis retrospectivo de los datos comerciales, Hinshaw (comunicación personal; AETA 2007) no encontró diferencias en el número de embriones transferibles de donantes superestimuladas 4 días después del tratamiento con estradiol y progesterona y las superestimuladas 2 días después del tratamiento con GnRH. En otro estudio (Wock et al., 2008),

tomó vacas lecheras tratadas con progesterona y fueron superestimuladas 4 días después de recibir estradiol ó 2 días después de GnRH; nuevamente no hubo diferencias significativas en el número de embriones transferibles entre los grupos. En otro análisis retrospectivo de datos comerciales (Steel y Hasler, 2009), vacas lecheras donantes superestimuladas 60 horas después de la administración de GnRH produjeron un número similar de embriones transferibles que aquellas superestimuladas 4 días después de recibir estradiol. A su vez las vacas tratadas con estradiol produjeron más embriones que las vacas superestimuladas entre los días 8 y 12 del ciclo estral, sin ningún tratamiento de sincronización de onda.

En el año 2008 al 2010 se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación después de la ovulación inducida por GnRH con el uso de dispositivos de progesterona (Bó et al., 2008; 2010). Esto se basó, en parte, en un informe anterior que indicaba que la respuesta ovulatoria a la GnRH puede ser aumentada por la administración de PGF para regresar el CL en el momento de la inserción de un dispositivo con progesterona que se mantuvo colocado durante 7 a 10 días (Small et al., 2009). En ese estudio, la ovulación y la emergencia de la onda se dieron consistentemente 1 a 2 días después de la administración de GnRH, lo que indica que este abordaje podría ser utilizado en grupos de donantes con ciclos al azar. El protocolo recomendado iniciado en etapas al azar del ciclo estral consiste en la administración de PGF en el momento de la inserción de un dispositivo con progesterona para inducir la regresión del cuerpo lúteo y provocar el desarrollo de un folículo persistente. Siete días más tarde (con el dispositivo con progesterona aún colocado), se administra GnRH para inducir la ovulación y la emergencia de la onda folicular, y se inician tratamientos con FSH 36 horas después.

Aunque este protocolo se diseñó para 4 días de FSH, un protocolo con 5 días de superovulación se puede lograr simplemente retrasando la administración de la segunda dosis de PGF y la retirada del dispositivo con progesterona en un día. Aparentemente la alternativa de FSH por 5 días sería más aplicable a vacas lecheras. En general, en esta serie de experimentos, más de 95% de los animales ovularon con la primera administración de GnRH (con la emergencia esperada de la onda folicular) y la respuesta superovulatoria y los números de óvulos/embriones y su calidad fueron similares a los obtenidos cuando la onda folicular se sincronizaba con estradiol. En un trabajo reciente se comparó este tratamiento con el que se administra GnRH 48 h después de la inserción de un dispositivo con progesterona y se comienza la superovulación 48 h después (Hinshaw et al., 2015). A pesar, que el tratamiento donde la GnRH se coloca 7 días después de la inserción del dispositivo con progesterona produjo 2 embriones más en promedio (14.8 ± 1.5 vs. 12.7 ± 1.5), las diferencias no fueron significativas.

Superovulación durante la primera onda folicular

Otra alternativa es inducir la ovulación e iniciar tratamientos superestimuladores en el momento de emergencia de la primera onda folicular. La emergencia de la onda folicular es siempre en el momento de la ovulación (Ginther et al., 1989), y experimentos llevados a cabo en ganado bovino (Nasser et al., 1993) y ovejas (Menchaca et al., 2002) han demostrado que es posible inducir la superovulación de folículos en la primera onda folicular. Adams et al. (1994) también informó que no había diferencias en la respuesta a la superovulación cuando se iniciaron los tratamientos con FSH en el momento de

aparición de la primera o la segunda onda folicular. Sin embargo, el éxito tras el inicio de los tratamientos superestimuladores en el momento de aparición de la primera onda folicular se basa en la determinación del momento de la ovulación o la detección precisa del celo, ya que se espera que la ovulación ocurra 1 día después.

Para evitar la necesidad de detectar celo y ovulación en donantes Nelore (*Bos indicus*), Nasser et al. (2011) indujeron la ovulación sincronizada con un protocolo diseñado para IATF. Se iniciaron tratamientos con FSH en el momento esperado de la ovulación (y la aparición de la primera onda folicular). Las respuestas a la superovulación no fueron distintas a las de un grupo contemporáneo superestimulado 4 días después del tratamiento con estradiol. Sin embargo, el número de embriones transferibles dependió del uso concomitante de un dispositivo de progesterona durante la superovulación ya que en el grupo donde no se utilizó un dispositivo se obtuvieron solo ovocitos infertilizados.

Tratamientos prolongados

Durante una onda folicular normal, los folículos subordinados regresan debido a la disminución de las concentraciones de FSH circulantes, causadas por las secreciones (estradiol e inhibina) de la cohorte y especialmente del folículo dominante (Adams et al., 1992). Los folículos pequeños requieren FSH para continuar su crecimiento, y la evidencia sugiere que los folículos de tamaño tan reducido como de 1 mm de diámetro comenzarán su crecimiento bajo la influencia de FSH (revisado por Adams et al., 2008). Quizás todo lo que se requiere para reclutar los folículos para la superovulación es hacer que estos folículos muy pequeños crezcan a un diámetro de 3 ó 4 mm, momento en el cual se puede iniciar el protocolo de tratamiento superestimulador común de 4 ó 5 días. Si se supone una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día, esto debería llevar de 2 a 3 días, es decir, añadir 2 a 3 días al protocolo de tratamiento de superovulación.

Por tanto, utilizando con éxito este abordaje, superestimulamos donantes en etapas al azar del ciclo estral, sin tener en cuenta la presencia de un folículo dominante (Bó et al., 2008). Se administraron pequeñas dosis de FSH dos veces al día durante 2 días y después se inició el protocolo de tratamiento con FSH normal sin un aumento de la cantidad total de FSH administrada. Como una alternativa, los 2 días de pre-tratamiento con FSH podían ser reemplazados por una sola inyección de eCG. En un estudio, la administración de 500 UI de eCG 2 días antes de iniciar tratamientos con FSH aumentó la respuesta a la superovulación en donantes de razas de carne (Caccia et al., 2000). Sobre todo en donantes de razas de carne que previamente habían producido un número de embriones no satisfactorios (citado en Bó et al., 2008).

Más recientemente, se ha investigado el efecto de prolongar el protocolo de tratamiento superestimulador tradicional de 4 días a 7 días (García Guerra et al., 2012). Alargar el protocolo de tratamiento de FSH a 7 días, sin aumentar la cantidad total de FSH administrada, aumenta el número de ovulaciones y la sincronía de las ovulaciones, y tendió a aumentar el número medio total de óvulos/embriones, óvulos fertilizados y embriones transferibles. En otras palabras, el protocolo de tratamiento superestimulador prolongado resultó en que más folículos llegaran a un tamaño ovulatorio y adquirieran la capacidad de ovular con un mayor número de ovulaciones, y sin disminución de la calidad de los ovocitos/embriones. Se concluyó que los protocolos de tratamiento prolongados con FSH pueden ser una estrategia

eficaz para reclutar pequeños folículos en la cohorte folicular disponible para superovulación, mientras que proporcionan el tiempo adicional necesario para que estos folículos lleguen a un tamaño ovulatorio y adquieran la capacidad de ovular. Además, estos resultados sugieren que los protocolos de tratamiento superestimulador tradicionales de 4 días pueden no proporcionar un tiempo adecuado para que todos los folículos dentro de la cohorte adquieran la capacidad de ovular.

Reducción del número de tratamientos con FSH

Debido a que la vida media de la FSH hipofisaria se ha demostrado que es de 5 horas en la vaca (Laster, 1972), los protocolos tradicionales de tratamiento superestimulador consisten en aplicar dos inyecciones diarias de FSH hipofisaria, durante 4 ó 5 días (Mapletoft y Bó, 2012). Esto requiere atención frecuente por parte del personal de la granja y aumenta la posibilidad de errores debido a la falta de cumplimiento. Además, los tratamientos dos veces al día pueden causar un estrés no deseado en las vacas donantes con una disminución de la respuesta superovulatoria, y/o alteración del pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982). Por lo tanto, cabe esperar que los protocolos simplificados reduzcan la manipulación de las donantes y mejoren su respuesta, sobre todo en animales menos dóciles.

Protocolos de administración única de FSH

Hace varios años, se informó que una única inyección de un extracto crudo de hipófisis diluido en un vehículo gelatina-salino, indujo una respuesta superovulatoria similar a la de un protocolo de tratamiento de 5 días, dos veces al día (Hill et al., 1985). Sin embargo, el número de embriones transferibles obtenidos con este tratamiento fue bastante bajo. Dado que se trataba de un extracto de hipófisis crudo que contenía grandes cantidades de LH, la mala calidad de los embriones obtenidos con este tratamiento puede haber sido debido a la gran cantidad de LH. Se ha demostrado que una alta actividad específica de LH, tal como se encuentra en extractos de hipófisis en bruto o eCG, es perjudicial para las respuestas superovulatorias y la calidad de ovocitos/embriones (Alkemade et al., 1993; Murphy et al., 1984).

Administración única subcutánea de FSH

Se ha demostrado que la vía de administración de extractos de hipófisis afecta a la respuesta superovulatoria. Se diseñaron dos experimentos para investigar la eficacia de un extracto hipofisario parcialmente purificado (Folltropin-V, Vetoquinol Inc.) por inyección intramuscular (im) o subcutánea (sc) en bovinos (Bó et al., 1994). La administración de FSH por inyecciones im dos veces al día dio como resultado una respuesta superovulatoria significativamente mayor que las inyecciones sc dos veces al día. La respuesta superovulatoria inferior después de la inyección sc de FSH se atribuyó a una absorción más lenta. A continuación, se comenzó la administración de FSH en una sola inyección sc. En una serie de experimentos que implican el uso de una Folltropin-V, una administración sc única de 400 mg de NIH-FSH-P1 en vacas de carne en condiciones corporales de medio a alto puntaje (> 3.5 en la escala de 1 a 5) dio como resultado una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo tradicional de tratamiento de 4 días con inyecciones im dos veces al día, (Bó et al., 1991, 1994). Curiosamente, una sola inyección de FSH fue completamente ineficaz. Hiraizumi et al. (2015) han

demostrado recientemente que la administración de una sola inyección sc de una preparación de gonadotropina diferente era también altamente eficaz en la inducción de superovulación en el ganado negro japonés (Japanese Black). Bó et al. (1994) informaron que la cantidad de tejido adiposo subcutáneo y el sitio de inyección afectaron la eficacia de la única administración sc de FSH. Aunque el tejido subcutáneo en la región del cuello fue eficaz en animales con buena condición corporal (>3,5 en la escala del 1 al 5), una sola inyección sc detrás de la paleta resultó en la respuesta superovulatoria más predecible. También se usó una aguja de 0,5 pulgadas para asegurar que la inyección se realizaba en tejido adiposo sc y no en músculo. Sin embargo, los resultados no fueron repetibles en las vacas con un menor puntaje de condición corporal (<3; Bó et al., 1994) o en vacas Holstein que presumiblemente tenían menos tejido adiposo sc (Hockley et al., 1992).

Administración subcutánea de FSH en dos inyecciones

Debido a la baja eficacia de una inyección sc única de FSH en vacas Holstein, se diseñó un experimento para determinar la respuesta superovulatoria cuando la dosis total de FSH se dividió en dos, con el 75% de la dosis administrada detrás de la paleta por vía sc en el primer día de tratamiento, y el 25% restante se administra 48 h después, cuando la prostaglandina F2 α (PGF) se administra normalmente (Lovie et al., 1995). En este estudio, la respuesta superovulatoria fue significativamente mayor en las vacas que reciben dos tratamientos im por día, que con un protocolo con una única inyección sc, pero la respuesta superovulatoria con el protocolo de dos inyecciones sc fue intermedia.

En otro experimento con bovinos *Bos indicus* (Bó et al., 1991), una sola inyección de Folltropin-V se comparó con dos inyecciones al día durante 4 días por administración im o sc. El número de ovulaciones fue significativamente mayor en el grupo que recibió una sola inyección sc que en todos los otros grupos, lo que sugiere que el estrés del manejo de los animales puede haber afectado adversamente la respuesta superovulatoria en animales que recibieron múltiples inyecciones, mientras que la inyección única im casi no tuvo eficacia confirmando nuestros resultados anteriores. En conjunto, los datos sugieren que una sola inyección sc de FSH detrás de la paleta es altamente eficaz en ganado con un puntaje de condición corporal de medio a alto, pero no es tan eficaz como las inyecciones im múltiples en la inducción de la superovulación en Holstein o ganado de carne con puntajes de condición corporal más bajos. Sin embargo, la división de la dosis de FSH en dos inyecciones sc con 48 h de diferencia mejoró la respuesta superovulatoria en Holstein, y presumiblemente en ganado de carne en condición corporal inferior. Como el uso de una inyección sc sola de FSH era condición corporal-dependiente y usuario-dependiente, se consideró necesaria la creación de un método más eficiente y "amigable" método de superovulación con una sola administración de FSH. En este sentido, se consideró importante desarrollar un protocolo que involucraba una inyección im para disminuir la variabilidad introducida por el estado corporal.

El uso de polímeros en protocolos de administración única

Un medio alternativo de prolongar la liberación de FSH después de una sola administración im sería combinarla con agentes que hacen que las hormonas se liberen lentamente del sitio de inyección durante varios días. Estos agentes se conocen comúnmente como polímeros, son biodegradables y no

reactivos en el tejido corporal, lo que facilita su uso en animales (Sutherland, 1991). Yamamoto et al. (1994) informaron que la FSH en una solución al 30% de polivinilpirrolidona (PVP) administrada como una sola inyección im dio como resultado una respuesta superovulatoria comparable a un protocolo con tratamientos dos veces al día. Takedomi et al. (1997) y Chasombat et al. (2013) también informaron que la FSH en PVP inducía superovulación en la vaca. Sin embargo, Callejas et al. (2002) y Bó y Mapletoft (observaciones no publicadas) no pudieron inducir una respuesta superovulatoria satisfactoria con una sola inyección de FSH en PVP. En otro estudio, la FSH disuelta en polietilenglicol (PEG) se informó que induce una respuesta superovulatoria satisfactoria (Choi et al., 2002). Kimura et al. (2007) informó que una sola inyección de FSH en gel de hidróxido de aluminio fue eficaz en la inducción de superovulación en el ganado, pero el hidróxido de aluminio se utiliza comúnmente como un coadyuvante de vacunas (Baylor, 2002), que puede impedir su uso para la superovulación. La preocupación de que la superovulación con este tipo de sustancias puede dar lugar al desarrollo de anticuerpos contra la FSH ha dado lugar a que no se utilicen.

Recientemente hemos completado una serie de experimentos en los que la FSH (Folltropin-V) diluida en una solución de ácido hialurónico al 2% se administró como una única inyección im, para evitar los efectos de la condición corporal. En general, el protocolo de inyección única dio como resultado un número similar de ovocitos/embriones que el protocolo tradicional de Folltropin-V dos veces al día (Tribulo et al., 2011). Sin embargo, el ácido hialurónico al 2% es muy viscoso y difícil de mezclar con el polvo liofilizado, especialmente en el campo. Especulamos que, aunque las preparaciones más diluidas de ácido hialurónico fueran menos eficaces que una única inyección, su uso podría mejorarse al dividir las inyecciones con 48 horas de diferencia, como habíamos mostrado previamente con inyecciones sc de FSH. El protocolo dividido de tratamiento intramuscular consistió en diluir Folltropin-V en polvo liofilizado con 10 ml de una solución de ácido hialurónico (MAP-5, Vetoquinol) y administrar dos tercios de la dosis total de FSH en el primer día, seguido de una segunda inyección con el tercio restante de la dosis total de FSH 48 horas más tarde, momento en que normalmente se administra PGF.

Se diseñó un experimento para comparar la eficacia del protocolo de inyección intramuscular dividida de FSH en dos concentraciones diferentes de ácido hialurónico, 1% y 0,5%, (MAP-5, Vetoquinol) con el protocolo de inyección intramuscular dos veces al día durante 4 días en el ganado bovino (Tribulo et al., 2012). En general, el número de embriones transferibles no difirió entre los grupos de tratamiento (control: $4,0 \pm 0,8$; ácido hialurónico 1%: $5,0 \pm 0,9$; ácido hialurónico 0,5%: $6,1 \pm 1,3$). Se concluyó que, en el ganado bovino, la división de la dosis de FSH diluida en ácido hialurónico en dos inyecciones im con 48 horas de separación resulta en una respuesta superovulatoria comparable al protocolo de 8 inyecciones intramusculares dos veces al día. Por otra parte, las soluciones menos concentradas de ácido hialurónico no son difíciles de mezclar con FSH, incluso bajo condiciones de campo. Estudios similares fueron realizados en ganado Brahman en Colombia (Mayor, Tesis de Maestría, IRAC, revisado en Bó et al., 2018) y más recientemente en Argentina (Barajas et al., 2018, datos sin publicar) y en Italia (Biancucci et al., 2016).

eCG en reemplazo de las cuatro últimas aplicaciones de FSH

En busca de posibles mejoras al tratamiento superestimulador, Price et al. (1999) demostraron que después del tratamiento superestimulador con FSH, los pulsos de LH disminuyen poco después de la primera aplicación de FSH y se acentúan durante las últimas aplicaciones y el periodo preovulatorio. Esto ocurre debido a un aumento en las concentraciones de estradiol y progesterona por la alta actividad esteroideogénica de las vacas superovuladas (Price et al., 1999). Como se sabe, la LH es esencial para el crecimiento final de los folículos y para la maduración completa de los ovocitos (Rosa, 2010). Es así como una manera de suplir la deficiencia endógena de los pulsos de LH, serían administraciones frecuentes de GnRH (Price et al., 1999) o recientemente el uso de eCG junto con FSH (Barros et al., 2008). La Gonadotropina Coriónica Equina es una glicoproteína compleja que tiene actividad FSH y LH (Murphy y Martinuk 1991). Es producida por las copas endometriales de la yegua preñada entre los 40 y 120 días de gestación (Combarous, 1992), y sintetizada como el clásico heterodímero de cadenas α y β (Moore y Ward, 1980). En los bovinos esta gonadotropina tiene un prolongado tiempo de acción, variando de 50 a 100 horas, debido a la proporción de ácido siálico (10 a 15%) presente en su molécula (Schams et al., 1978). Es así como debido a su prolongada vida media, la eCG persiste por hasta 10 días en la circulación de las hembras bovinas (Dieleman et al., 1993).

Una característica notable de la eCG que ha sido aprovechada en múltiples contextos experimentales y comerciales, es su capacidad para expresar actividad FSH en especies no équidas (Murphy, 2012). Pese a ello la comprensión de este fenómeno continúa sin entenderse. Sin embargo se ha encontrado en humanos, que el receptor de FSH contiene un sitio de unión oculto capaz de unirse a la hCG (Lin et al., 2007). Es así como naturalmente ocurren mutaciones en el receptor de la FSH que hacen posible la unión a la hCG (Vassart y Costagliola, 2011). Se cree que el mecanismo por el cual las mutaciones inducen promiscuidad en los receptores está relacionada con su capacidad para aumentar la actividad constitutiva del receptor (Vassart y Costagliola, 2011), y de esta forma permitir que la hormona LH puedan interactuar con los sitios ocultos y producir señales a través del receptor de FSH (Murphy, 2012). De tal manera que la promiscuidad en la unión al receptor, en particular el receptor de la FSH, es la base para la actividad dual de la eCG, ya que su estructura primaria le permite interactuar con este receptor y además este efecto se ve reforzada por su larga vida media (Murphy, 2012).

En los inicios de la transferencia de embriones, la eCG fue empleada para inducir superovulación en hembras donantes (Murphy, 2012). Sin embargo, pese a que su larga vida media confiere la ventaja de superovular por medio de una única inyección, esta característica también limita su utilidad, ya que tiene la tendencia a estimular en exceso el ovario, resultando en múltiples folículos anovulatorios y un rendimiento de embriones viables altamente variable (Bever et al., 1989). Recientemente también se demostró que hay una disminución en la respuesta superovulatoria después de la tercera aplicación consecutiva de 2000 UI de eCG, debido probablemente a la producción de anticuerpos anti-eCG (Baruselli et al., 2008). Sin embargo, en los últimos años, y en relación con lo planteado por Price et al., (1999), las dos últimas dosis de FSH fueron sustituidas por diferentes dosis de eCG. Es así como en algunos estudios se han encontrado efectos benéficos de la asociación de FSH+eCG, (Barros et al.,

2008; Reano et al., 2009; Mattos et al., 2011), mientras que en otros estudios no tuvo ningún efecto (Sartori et al., 2009; Davis et al., 2012). Debido a que en la mayoría de los trabajos referenciados, se ha comprobado el efecto benéfico de la adición de eCG en el último día de la superovulación, en la siguiente serie de experimentos se buscó generar información sobre los beneficios de utilizar diferentes dosis de eCG en el momento que se coloca la primera PGF (Día 6), de un protocolo de superovulación con progesterona, estradiol y FSH. Los dos primeros experimentos fueron realizados utilizando vacas cruzas de razas de carne que se superovularon para las prácticas de los estudiantes de la Especialización en Reproducción Bovina del IRAC y la UNC y los dos últimos experimentos fueron realizados utilizando donantes puras de pedigree de la raza Bonsmara que fueron colectadas por técnicos experimentados.

Experimento 1

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de 400 u 800 UI de eCG en la producción de embriones. Para este experimento, se utilizaron 47 vacas cruzas de razas para carne con una condición corporal entre 2 y 4 (Escala 1-5). Las donantes fueron asignadas al azar para conformar 3 grupos de tratamientos. En el Día 0, todas las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con 1.2 gr de progesterona (Diprogest 1200®, Zoovet, Argentina), junto con 50 mg de progesterona por vía intramuscular (i.m., Progestar®, Syntex, Argentina) y 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE, Gonadiol®, Syntex, Argentina) i.m. El Día 4 en la mañana, se iniciaron los tratamientos superestimuladores utilizando de 200 a 260 mg de Folltropin-V (Vetoquinol, Canadá), de acuerdo al grupo tratamiento. Las donantes del Grupo FSH (Control) recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V i.m. (dosis total: 260 mg) en forma decreciente cada 12 horas y por 4 días. El Día 6 en la mañana y en la tarde recibieron 500 μ g de Cloprostenol Sódico (PGF, Ciclase DL®, Syntex, Argentina). El Día 7 en la tarde se retiró el dispositivo intravaginal y el Día 8 en la mañana, recibieron 100 μ g de Gonadorelina Acetato (Gonasyn Gdr®, Syntex, Argentina). El Día 8 a la tarde y el Día 9 en la mañana fueron inseminadas, usando un toro de reconocida fertilidad. El Grupo FSH+400 eCG recibió solo las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V (dosis total: 200 mg) y en la mañana del Día 6, recibieron 400 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG, Novormón®, Syntex, Argentina) en una única dosis. El Grupo FSH+800 eCG recibió también las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V (dosis total: 200 mg) y en la mañana del Día 6, recibieron 800 UI de eCG en una única dosis. En estos últimos dos grupos, la administración de PGF, remoción del dispositivo, GnRH e inseminaciones fueron realizadas al igual que en el Grupo FSH. El Día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS (Stringfellow y Givens, 2010). Los datos fueron transformados por raíz cuadrada y analizados por ANOVA. Cuando las diferencias fueron significativas, se compararon las medias entre los grupos por el Test LSD de Fisher ($P < 0,05$; Di Rienzo et al 2015). No se encontraron diferencias en la cantidad de CL, folículos anovulatorios, ovocitos/embriones colectados y ovocitos fertilizados entre los grupos tratamiento (Tabla 1). Sin embargo, hubo un número mayor de embriones transferibles en el Grupo FSH+800 eCG que en el Grupo FSH+400 eCG (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta superovulatoria (media \pm EE) en donantes de embriones tratadas con FSH o con FSH+eCG.

Grupos	n	CL	Folículos anovulatorios	Ovocitos/Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Transferibles
FSH	16	13,1 \pm 1,1	4,8 \pm 1,3	8,1 \pm 1,2	5,2 \pm 1,2	2,5 \pm 0,6 ^a
FSH+400 eCG	15	13,2 \pm 1,4	2,3 \pm 0,7	7,3 \pm 1,4	4,3 \pm 0,9	2,2 \pm 0,5 ^a
FSH + 800 eCG	16	15,4 \pm 1,3	3,8 \pm 1,6	9,3 \pm 1,4	7,8 \pm 1,4	5,8 \pm 1,3 ^b
Valor P		0,3986	0,2795	0,5840	0,0952	0,0090

^{ab} Medias con distintos superíndices indican diferencias significativas.

Experimento 2

El objetivo del Experimento 2 fue confirmar los resultados del Experimento 1. Para este experimento, se utilizaron 32 vacas cruzadas de razas para carne con una condición corporal entre 2 y 4 (Escala 1-5). Las donantes fueron asignadas al azar para conformar 2 grupos de tratamientos, el Grupo Control y el Grupo con 800 UI de eCG en el Día 6 del Experimento 1. En el Día 0, todas las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con 1.2 gr de progesterona, junto con 50 mg de progesterona i.m. y 2 mg de BE i.m. El Día 4 en la mañana, se iniciaron los tratamientos utilizando de 200 a 260 mg de Folltropin-V, de acuerdo al grupo tratamiento. Las donantes del Grupo FSH (Control) recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V i.m. (dosis total: 260 mg) en forma decreciente cada 12 horas y por 4 días. El Día 6 en la mañana y en la tarde recibieron PGF. El Día 7 en la tarde se retiró el dispositivo intravaginal y el Día 8 en la mañana, recibieron GnRH. El Día 8 a la tarde y el Día 9 en la mañana fueron

inseminadas, usando toros de reconocida fertilidad. El Grupo FSH+800 eCG recibió solo las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V (dosis total: 200 mg) y en la mañana del Día 6, recibieron 800 UI de eCG en una única dosis. En este último grupo, la administración de PGF, remoción del dispositivo, GnRH e inseminaciones fueron realizadas al igual que en el Grupo FSH. El Día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS. Los datos fueron analizados como en el Experimento 1. No se encontraron diferencias en la cantidad de CL, folículos anovulatorios, ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles entre los grupos (Tabla 2). En base a los resultados preliminares de los dos experimentos se concluyó que la adición de 800 UI de eCG en el Día 6 puede ser una alternativa viable para superestimular vacas para carne y se decidió abordar otros dos trabajos utilizando donantes comerciales que fueron colectadas por técnicos experimentados.

Tabla 2. Respuesta superovulatoria (media \pm EE) en donantes de embriones tratadas con FSH o con FSH+eCG.

Grupos	n	CL	Folículos anovulatorios	Ovocitos/Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Transferibles
FSH	15	15,1 \pm 1,3	2,7 \pm 0,5	7,5 \pm 1,1	5,5 \pm 0,9	2,7 \pm 0,5
FSH+800 eCG	17	13,2 \pm 1,1	1,8 \pm 0,3	7,0 \pm 0,8	5,5 \pm 0,7	3,2 \pm 0,6
Valor P		0,3410	0,3806	0,7673	0,9223	0,7737

^{ab} Medias con distintos superíndices indican diferencias significativas.

Experimento 3

El objetivo del Experimento 3 fue confirmar los resultados de los experimentos anteriores utilizando donantes comerciales que fueron colectadas por técnicos experimentados. Para este experimento, se utilizaron 12 vacas de la raza Bonsmara con una condición corporal entre 2 y 4 (Escala 1-5), que fueron divididas al azar para ser superestimuladas dos veces con 35 días de intervalo, con dos tratamientos en un diseño cruzado. En el Día 0, todas las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con 1.2 gr de progesterona, junto con 50 mg de progesterona i.m. y 5 mg de Estradiol-17 β i.m. El Día 4 en la mañana, se iniciaron los tratamientos superestimuladores utilizando un total de 220 y 300 mg de Folltropin-V, de acuerdo al grupo. Las donantes del Grupo FSH (Control) recibieron 8 aplicaciones de Folltropin-V i.m. (dosis total: 300 mg) en forma decreciente cada 12 horas y por 4 días. El Día 6 en la mañana y en la tarde recibieron PGF. El Día 7 de mañana se retiró el dispositivo intravaginal y el Día 8 en la mañana, recibieron GnRH. El Día 8 a la tarde y el Día 9 en la

mañana fueron inseminadas, usando dos toros de reconocida fertilidad. El Grupo FSH+800 eCG recibió solo las primeras 4 aplicaciones de Folltropin-V (dosis total: 220 mg) y en la mañana del Día 6, 800 UI de eCG en una única dosis. La administración de PGF, remoción del dispositivo, GnRH e inseminaciones fueron realizadas al igual que en el Grupo FSH. El Día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS. Los datos fueron analizados como en el Experimento 3. No se encontraron diferencias en la cantidad de CL, folículos anovulatorios, ovocitos/embriones y embriones transferibles entre los grupos tratamiento (Tabla 3). Sin embargo, el número de ovocitos fertilizados fue mayor en el Grupo FSH que en el Grupo FSH+800 eCG.

Tabla 3. Respuesta superovulatoria (medias±EE) en donantes de embriones tratadas con FSH o con FSH+eCG.

Grupos	n	CL	Folículos anovulatorios	Ovocitos/Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Transferibles
FSH	12	15,5±1,8	3,8±1,0	11,7±2,5	10,5±2,3 ^a	5,7±1,4
FSH+800 eCG	12	15,2±1,2	4,9±1,2	9,6±1,5	6,8±1,0 ^b	5,3±0,7
Valor P		0,8344	0,1641	0,1153	0,0023	0,7246

^{ab} Medias con distintos superíndices indican diferencias significativas.

Experimento 4

El objetivo del Experimento 4 fue evaluar el efecto de la adición de diferentes dosis de eCG en tratamientos superestimuladores con FSH. Para este experimento, se utilizaron 10 vacas de la raza Bonsmara con una condición corporal entre 3 y 4 (Escala 1-5) en un diseño cruzado en dos replicas. En cada replica las donantes fueron asignadas al azar para conformar 2 grupos de tratamientos. En el Día 0, todas las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con 1.2 gr de progesterona, junto con 50 mg de progesterona i.m, y 5 mg de Estradiol-17β (17β Estradiol®, Rio de Janeiro, Argentina) i.m. El Día 4 en la mañana, se iniciaron los tratamientos superestimuladores utilizando un total de 200 mg de Folltropin-V, en cada grupo de tratamiento. Las donantes del Grupo FSH+800 eCG (Control) y FSH+600 eCG recibieron 4 aplicaciones de Folltropin-V i.m. en forma decreciente cada 12 horas y por 2 días. El Día 6 en la mañana, junto con la primera aplicación de PGF, las donantes del grupo

FSH+800 eCG, recibieron 800 UI de eCG en una única dosis, mientras que las del grupo FSH+600 eCG recibieron 600 UI eCG en el mismo momento. Todas las donantes recibieron la segunda PGF el Día 6 en la tarde, los dispositivos fueron removidos el Día 7 de mañana y se aplicó GnRH el Día 8 de mañana. Las donantes fueron inseminadas en el Día 8 en la tarde y el Día 9 en la mañana usando un toro de reconocida fertilidad. El Día 15 se colectaron los embriones y fueron evaluados según las normas de la IETS. Los datos fueron analizados mediante el procedimiento de Modelos Lineales Generalizados y Mixtos (MLGM). Cuando las diferencias fueron significativas, se compararon las medias entre los grupos por el Test LSD de Fisher ($P < 0,05$; Di Rienzo et al 2107). No se encontraron diferencias en la cantidad de CL, folículos anovulatorios, ovocitos/embriones colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles entre los grupos tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Respuesta superovulatoria (medias±EE) en donantes de embriones Bonsmara tratadas con FSH+eCG.

Grupos	n	CL	Folículos anovulatorios	Ovocitos/Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Transferibles
FSH	19	9,7±0,8	1,7±0,3	6,7±0,6	5,2±0,8	3,4±0,6
FSH+800 eCG	20	10,0±0,9	2,4±0,3	6,2±1,1	4,6±0,9	3,8±0,7
Valor P		0,8288	0,1405	0,2578	0,1327	0,5921

Las medias no difieren significativamente.

CONCLUSIONES

La adición de eCG en los protocolos de sincronización de donantes de embriones bovinos en reemplazo de las cuatro últimas inyecciones de FSH del tratamiento convencional es una alternativa viable que ayuda a simplificar el protocolo de superovulación. El uso de protocolos que controlan el desarrollo folicular y la ovulación tienen la ventaja de permitir la aplicación de técnicas de reproducción asistida sin la necesidad de detectar celo. Estos tratamientos han demostrado ser prácticos y fáciles de realizar por el personal de campo. En los esquemas de superovulación, el estradiol es muy eficaz en la sincronización de la emergencia de la onda folicular, pero no está disponible en muchos países. Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular produce resultados variables, la presincronización con un dispositivo que libera progesterona se ha demostrado que mejora la respuesta a la GnRH, permitiendo la superovulación durante la primera onda folicular después de la ovulación. Protocolos simplificados de

superovulación pueden realizarse administrando una o dos dosis sc de FSH detrás de la paleta en vacas de carne o con el uso de una formulación de liberación lenta con ácido hialurónico. Si bien en ambos trabajos se ha demostrado que es posible inducir una respuesta superovulatoria, hay factores como la dosis total de FSH administrada que deben tenerse en cuenta para utilizar estos protocolos. Por último, la adición de eCG en reemplazo de las últimas dos inyecciones de FSH, es un tratamiento interesante para aportar más LH a la fase final del tratamiento y simplificar el protocolo reemplazando las últimas 4 inyecciones de FSH por una sola administración de 600 u 800 UI de eCG.

Agradecimientos

La investigación fue apoyada por el Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Argentina (IRAC) y por la Universidad Nacional de Villa María. También agradecemos el apoyo de la Empresa Vetoquinol Laboratoire Pharmaceutique Veterinaire de Francia.

REFERENCIAS

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94:177-188.
- Adamsa Gp, Jaiswal R, Singh J, Mahli P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69:72-80.
- Adams GP, Nasser LF, Bó GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42:1103-1113.
- Alkemade SJ, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins. *Proc AETA, Portland, Maine*. 1993; pp.1-19.
- Barros CM, Barcelos AC, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20:152 (abstract).
- Baruselli PS, Sá Filho M, Martins CM, Naser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006; 65:77-88.
- Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bo GA. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Dom Anim* 2012; 47 (Suppl. 4):134-141.
- Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine* 2002; 20:18-23.
- Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 49:1-12.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van Tol HT, Blankenstein DM, Van Den Broek J. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J Reprod Fertil* 1989; 87:745-754.
- Bianucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, Stradaoli G. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology* 2016; 85: 914-921.
- Bó GA, Hockley D, Tribulo H, Jofre F, Tribulo R, Busso N, Barth AD, Mapletoft RJ. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 1991; 35:186 (abstract).
- Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 1994; 42:963-975.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous Control of Follicular Wave Emergence in Cattle. *Theriogenology* 1995; 43:31-40.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57:53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Chesta P, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006; 65:89-101.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 2008; 69:81-87.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo H, Tribulo R, Rogan D, Mapletoft RJ. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:106-112.
- Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 2014, 81:38-48.
- Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. *Theriogenology* 2018; 112:26-33.
- Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000; 53:495 (abstract).
- Callejas SS, Alberio R, Cabodevila JA, Dulout F, Aller J, Teruel M. Ovarian stimulation with FSH-P in single dose in polyvinylpyrrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. *Rev Arg Prod Anim* 2002; 22:141-151.
- Chasombat J, Sakhong D, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J Reprod Dev* 2013; 59:214-218.
- Choi SH, Park YS, Cho SR, Kang TY, Sin SH, Kang SS, Rho GJ And Choe SY. Superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol. *Korean J Emb Trans* 2002; 17:67-77.
- Combarous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews* 1992; 13:670-669.
- Davis RL, Arteaga A, Hasler JF. Addition of equine chorionic gonadotropin to a traditional follicle stimulating hormone protocol for superovulation of *Bos taurus* beef cows. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24:224-225.
- Deyo CD, Colazo MG, Martinez MF, Mapletoft RJ. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave

- emergence for superovulation in cattle. *Theriogenology* 2001; 55:513 (abstract).
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
 - Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, De Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39:25-41.
 - García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 2012; 78:353-360.
 - Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J Reprod Fertil* 1989; 87:223-230.
 - Hill KG, McFarland CW, Rorie RW, Viker SD, Godke RA. A single 50 mg injection of follicle stimulating hormone (FSH) for superovulation of embryo donor cattle. *Theriogenology* 1985; 23:196 (abstract).
 - Hinshaw RH, Switzer ML, Mapletoft RJ, Bó GA. A comparison of two approaches for the use of GnRH to synchronize follicle wave emergence for superovulation. *Reprod Fertil Dev* 2015; 27: 263-264.
 - Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, Hashiyada Y. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over 3 days. *Theriogenology* 2015; 83:466-473.
 - Hockley DK, Bó GA, Palasz AT, Del Campo MN, Mapletoft RJ. Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 1992; 37:224 (abstract).
 - Kimura K, Hirako M, Iwata H, Auki M, Kawaguchi M, Seki M. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 2007; 68:633-639.
 - Lane EA, Austin EJ, Crowe MA. Estrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals; A review. *Anim Reprod Sci* 2008; 109:1-16.
 - Laster DJ. Disappearance of and uptake of 125I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 1972; 30:407-415.
 - Lovie M, Garcia A, Hackett, Mapletoft RJ. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Follitropin in Holstein cows. *Theriogenology* 1994; 41:241 (abstract).
 - Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42:601-611.
 - Mapletoft RJ, Bó GA. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012; 24:278-283.
 - Mapletoft RJ, Bennett-Steward K, Adams Gp. Recent Advances in the Superovulation of Cattle. *Reprod Nut Dev* 2002; 42: 601-611.
 - Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 57: 23-33, 1999.
 - Mattos MC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Franco MM, Mourão GB. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Anim. Reprod. Sci.* 2011; 125:119-123.
 - Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 2002; 58:1713-1721.
 - Moore WT Jr, Ward DN. Pregnant mare serum gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:6923-6929.
 - Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews* 1991; 12:27-44.
 - Murphy BD, Mapletoft RJ, Manns J, Humphrey WD. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984; 21:117 125.
 - Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012; 9:223-230.
 - Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft Rj. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40:713-724.
 - Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; 76:320-327.
 - Perry G. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *IETS Newsletter* 2014, 32:14-26.
 - Price CA, Carrière PD, Gosselin N, Kohram H, Guibault LA. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology* 1999; 51:37-46.
 - Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bó GA. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba. Argentina, 2009; pp. 54.
 - Rosa FS. 2010. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus. Tesis Magister. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 30 pp.
 - Sartori R, Guardieiro MM, Barros CM, Bastos MR, Machado GM, Leme LO. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superovulated Nelore heifers. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21:245 (abstract).

- Schams S, Menzer Ch, Schallenberger E, Hoffman B, Haha R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: Control of Reproduction the Cow. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1978; pp. 25-80.
- Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009; 71:698–706.
- Stoebel DP, Moberg GP. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 1982; 65:92–96.
- Stringfellow DA, Givens MD. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS, 2010.
- Sutherland W. Biomaterials - Novel material from biological sources. In: Byrom D, ed. New York: Stockton Press. 1991; 307-333.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 1995; 43:1259–1268.
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltrano D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 2011; 129:7-13.
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bó GA. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 2012; 77:1679-1685.
- Wock JM, Lyle LM, Hockett ME. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superovulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20:228 (abstract).
- Yamamoto M, Oow M, Kawaguchi M, Suzuki T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 1994; 41:747-755.