

¿Qué novedades hay en la superovulación del ganado bovino?

Reuben J. Mapletoft⁽¹⁾ y Gabriel A. Bó⁽²⁾

Resumen

En la aplicación de técnicas de reproducción asistida en el ganado vacuno, los protocolos diseñados para controlar la dinámica de la onda folicular y la ovulación han reducido, e incluso eliminado, la necesidad de detectar celo. En los esquemas de superovulación, el control de la emergencia de la onda folicular y la ovulación también ha eliminado la necesidad de detección de celos en las donantes para facilitar su manejo. Recientemente se han desarrollado abordajes alternativos para el control de la emergencia de la onda folicular y nuevos protocolos que no sólo sincronizan dicha emergencia, sino que también pueden reclutar folículos adicionales a la onda y permitir la maduración de los folículos superestimulados antes de la inducción de la ovulación. Para simplificar aún más los tratamientos superestimuladores se ha diluido la FSH en un polímero de liberación lenta que permite la inducción de la superovulación con sólo dos inyecciones intramusculares. En conjunto, los nuevos protocolos de tratamiento han facilitado la aplicación generalizada de tecnologías de reproducción asistida en el ganado vacuno.

Introducción

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^(8, 9) y el momento de la ovulación^(5, 10) 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 a tiempo fijo (IATF) en donantes, sin necesidad de detectar celo. Sin embargo, el tratamiento más comúnmente utilizado para la sincronización de emergencia de la onda folicular para inducir la superovulación implica el uso de estradiol-17 β o uno de sus ésteres, que no pueden ser utilizados en muchos países debido a preocupaciones sobre los efectos de las hormonas esteroides en la cadena alimentaria. El propósito

de este trabajo es revisar los nuevos adelantos en materia de superovulación de ganado vacuno con los productos farmacéuticos disponibles.

Tradicionalmente, los tratamientos de gonadotropina se iniciaban durante la fase lútea media, aproximadamente 9 a 11 días después del celo^(8, 22), cercano al tiempo de emergencia de la segunda onda folicular⁽¹⁶⁾. 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⁽²⁶⁾. Por lo tanto, los protocolos de tratamiento convencionales tienen dos inconvenientes: 1) el requisito de disponer de personal capacitado dedicado a la detección de celo, y 2) la necesidad de tener todas las donantes en celo al mismo tiempo con el fin de iniciar los tratamientos en los grupos de animales.

(1) Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

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

Conferencia dictada en el X Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC), Córdoba, 4 al 6 de Julio de 2013.

Recientemente hemos resumido los protocolos de superovulación actuales para el ganado vacuno⁽²³⁾.

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⁽⁶⁾. Este tratamiento ha sido utilizado por los profesionales de todo el mundo para la superestimulación del ganado, 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 folicular guiada por ecografía e iniciar el tratamiento superestimulador 1 o 2 días más tarde⁽⁶⁾. 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, siendo muy difícil aplicarla en el campo.

Otra alternativa es el uso de la GnRH para inducir la ovulación del folículo dominante⁽²¹⁾ que sería seguido por emergencia de la onda folicular 1 a 2 días más tarde⁽²⁴⁾. Sin embargo, la aparición de una nueva onda folicular se sincronizó solamente cuando el tratamiento causó la ovulación. Sin pre-sincronización, la primera aplicación de GnRH provoca la ovulación en menos del 60% de los animales^(24, 25). No es sorprendente que el tratamiento con GnRH en momentos al azar del ciclo estral, antes de iniciar tratamientos superestimuladores, haya dado lugar a respuestas superovulatorias más bajas que los tratamientos iniciados después de la aspiración folicular o del tratamiento con estradiol⁽¹⁴⁾.

Más recientemente, 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⁽³⁴⁾, vacas lecheras

tratadas con progesterona (n=411) 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⁽²⁹⁾, vacas lecheras donantes superestimuladas 60 horas después de la administración de GnRH (n=245) produjeron un número similar de embriones transferibles que aquellas superestimuladas 4 días después de recibir estradiol (n=691). Obviamente, deben llevarse a cabo estudios controlados con el uso de GnRH para validar estos resultados prometedores, pero es digno de mención que, en cada uno de estos informes de éxito, se insertó un dispositivo con progesterona al menos 2 días antes del tratamiento con GnRH y esto puede haber aumentado la probabilidad que haya un folículo en condiciones de responder en el momento del tratamiento.

La superovulación durante la primera onda folicular después de ovulación inducida por GnRH

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⁽¹⁶⁾, y experimentos llevados a cabo en ganado bovino⁽²⁶⁾ y ovejas⁽²⁵⁾ han demostrado que es posible inducir la superovulación de folículos en la primera onda. Adams y col.⁽³⁾ también informaron 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 y col.⁽²⁷⁾ 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 supero-

vulación no fueron distintas a las de un grupo contemporáneo superestimulado 4 días después del tratamiento con estradiol. Sin embargo, el número de embriones transferibles depende del uso concomitante de un dispositivo de progesterona. La necesidad de progesterona durante la superestimulación de la primera onda folicular requiere más estudio.

Recientemente hemos llevado a cabo una serie de experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación en la primera onda folicular después de la ovulación inducida por GnRH con el uso de dispositivos de progesterona ⁽¹¹⁾. 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 de progesterona que se mantuvo colocado durante 7 a 10 días ⁽²⁸⁾. 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 de progesterona para inducir la regresión del cuerpo lúteo y provocar el desarrollo de un folículo persistente. Siete días más tarde (con el dispositivo 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. El protocolo se puede organizar fácilmente en un calendario tal como se ilustra en la Tabla 1. Aunque este protocolo se diseñó para 4 días de FSH, un protocolo con 5 días de superestimulación se puede lograr simplemente retrasando la administración de la segunda dosis de PGF y la retirada del dispositivo en un día. 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 fue sincronizada con estradiol.

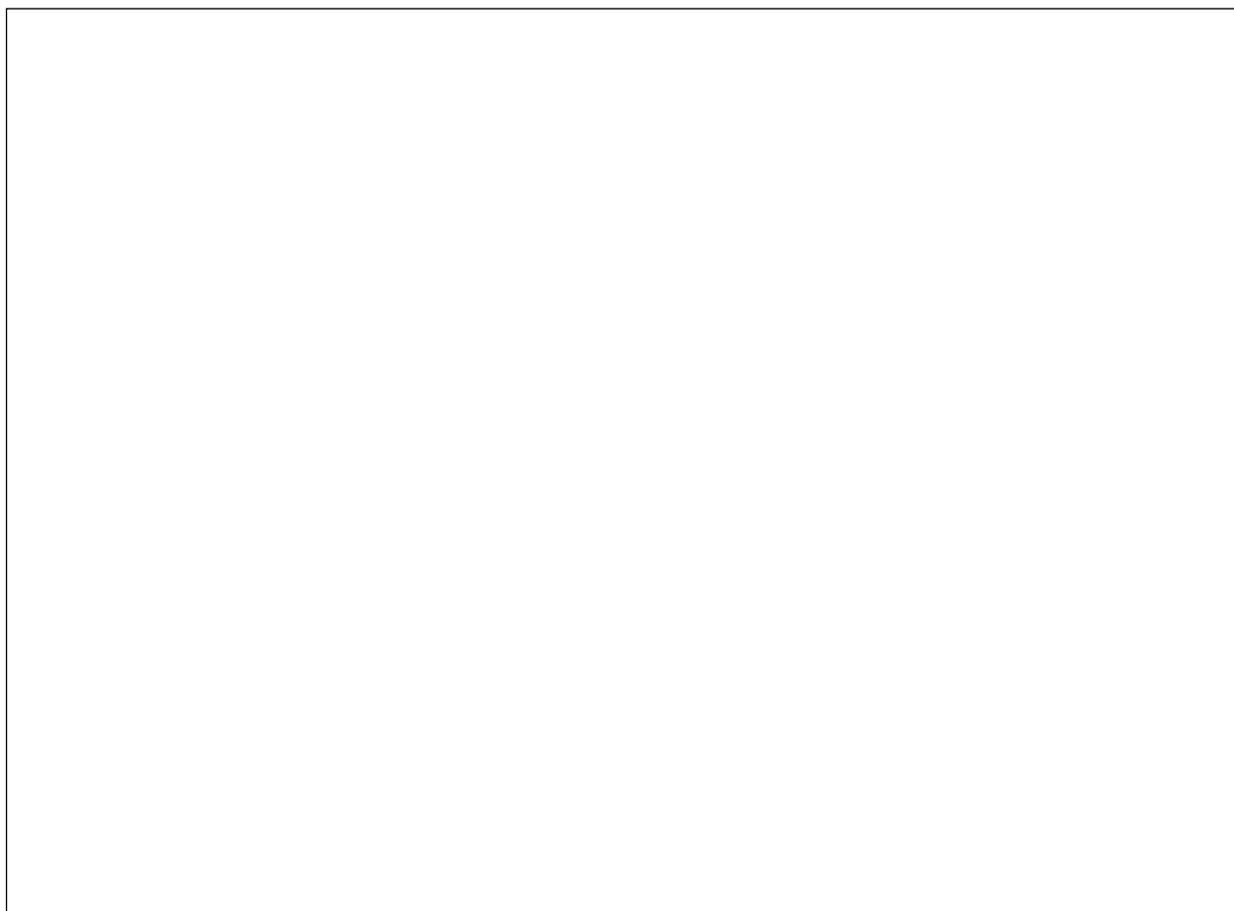


Tabla 1. Calendario de tratamiento para la superovulación en vacas donantes después de una ovulación inducida por GnRH. Las donantes reciben un dispositivo con progesterona y una PGF para inducir la formación de un folículo persistente y seguidamente GnRH 7 días más tarde (con el dispositivo aún colocado). Treinta y seis horas después de la GnRH, se inicia la sobreestimulación con FSH dos veces por día durante 4 días, y se administra PGF con las dos últimas inyecciones de FSH; el dispositivo con progesterona se retira al momento de administrar la última inyección de FSH. Se induce la ovulación con GnRH 24 horas después de retirar el dispositivo, las donantes son inseminadas a tiempo fijo (IATF) 12 y 24 horas más tarde y se realiza la colecta de ovocitos/embriones 7 días después de la IA.

Domingo	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado
		Colocación dispositivo con P4 e inyección de PGF				
		GnRH (AM)	Inicio tratamiento con FSH (PM)	FSH (AM y PM)	FSH (AM y PM)	FSH (AM y PM) PGF (PM)
FSH, Retiro dispositivo con P4 e inyección de PGF (AM)	GnRH (AM) IA (PM)	IA (AM)				
	Recolección de embriones					

Avances en relación al folículo subordinado

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 ⁽¹⁾. 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 ⁽⁴⁾. Quizás todo lo que se requiere para reclutar los folículos para la superestimulación 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 superestimulación. Como la FSH exógena reemplaza los niveles endógenos deprimidos por los productos de secreción del folículo dominante, planteamos la hipótesis de que la presencia de un folículo dominante no tendría ningún efecto sobre la respuesta a la 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 ⁽¹¹⁾. 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 tendió a aumentar la respuesta a la superovulación en donantes de razas carniceras ⁽¹³⁾. En donantes de razas para carne que previamente habían producido un número de embriones no satisfactorios, el tratamiento previo con 500 UI de eCG produjo un aumento en el número de embriones logrados en comparación con los obtenidos sin eCG ⁽¹¹⁾. Se planteó la hipótesis de que la eCG reclutó folículos adicionales en la onda antes de iniciar los tratamientos de FSH.

Más recientemente, se investigó el efecto de prolongar el protocolo de tratamiento superestimulador tradicional de 4 días a 7 días con el fin de reclutar más folículos en la onda ⁽¹⁵⁾. Alargar el protocolo de tratamiento de FSH a 7 días, sin aumentar la cantidad total de FSH administrada, aumentó 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 superestimulación, al proporcionar 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. Esto requiere más estudio.

Reducción del número de tratamientos con FSH en un protocolo de superestimulación

Debido a que la vida media de la FSH hipofisiaria en la vaca es de 5 horas ⁽¹⁹⁾, los protocolos tradicionales de tratamiento superestimulador consisten en aplicar dos inyecciones diarias de FSH hipofisiaria, durante 4 ó 5 días ⁽²³⁾. Esto requiere atención frecuente por parte del personal del establecimiento y aumenta la probabilidad 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 ⁽³⁰⁾. 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.

Hace más de 15 años, se informó que una sola administración subcutánea de FSH en vacas de razas para carne con alta condición corporal (> 3 de 5) daba lugar a una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional durante 4 días ⁽⁷⁾. Sin embargo, los resultados no eran repetibles en vacas Holando, que tenían menos tejido adiposo ⁽¹⁷⁾. En un estudio posterior en vacas Holando, la inyección única se dividió en dos dosis, con el 75% de la dosis de FSH administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el 25% restante administrada 48 horas después, cuando se administra normalmente PGF ⁽²⁰⁾. Aunque se mejoró la respuesta superovulatoria, los resultados numéricos fueron

menores que con el protocolo de inyecciones dos veces al día.

Una alternativa para inducir una respuesta superovulatoria repetible con una única inyección de FSH sería combinar el extracto de hipófisis con agentes que causan la liberación lenta de la hormona durante varios días. Estos agentes se conocen comúnmente como polímeros, son biodegradables y no reactivos en los tejidos, lo que facilita su uso en animales ⁽³¹⁾. Recientemente hemos completado una serie de experimentos en los que la FSH diluida en una solución de ácido hialurónico al 2%. Se administró como una única inyección intramuscular, para evitar los efectos de la condición corporal. En general, el protocolo de inyección única dio como resultado un número similar de óvulos/embriones que el protocolo tradicional de FSH dos veces al día ⁽³²⁾. Sin embargo, hyaluronan al 2% es muy viscoso y difícil de mezclar con FSH, 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 subcutáneas de FSH. El protocolo dividido de tratamiento intramuscular consistió en diluir FSH en polvo liofilizado con 10 ml de una solución de ácido hialurónico 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%, con el protocolo de inyección intramuscular dos veces al día durante 4 días en el ganado vacuno ⁽³³⁾. En general, el número de embriones transferibles no difirió entre los grupos de tratamiento (control: $4,0 \pm 0,8$; 1% hyaluronan: $5,0 \pm 0,9$; 0,5% hyaluronan: $6,1 \pm 1,3$). Se interpretó que los datos sugieren que, en el ganado vacuno, la división de la dosis de FSH, ya sea en ácido hialurónico en dos inyecciones intramusculares con 48 horas de separación, o con el protocolo de inyección intramuscular tradicional dos veces al día, darían lugar a una respuesta comparable en cuanto a la

superovulación. Por otra parte, las soluciones menos concentradas de ácido hialurónico no eran difíciles de mezclar con FSH, incluso bajo condiciones de campo.

Resumen y conclusiones

El uso de protocolos que controlan el desarrollo folicular y la ovulación tiene 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 los establecimientos. 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 pre-sincronización con un dispositivo que libera progesterona ha demostrado que mejora la respuesta a la GnRH, permitiendo superestimulación durante la primera onda folicular después de la ovulación, con resultados que no difieren de los obtenidos con la utilización de estradiol. Protocolos alargados de tratamiento de superestimulación parecen tener como consecuencia el reclutamiento de folículos adicionales en la onda y permiten que transcurra el tiempo necesario para que estos folículos adquieran la capacidad de ovular. Por otra parte, los protocolos de tratamiento de 4 días no otorgan suficiente tiempo para que todos los folículos desarrollen la capacidad de ovular. Por último, con el uso de una formulación de liberación lenta con ácido hialurónico se ha demostrado que es posible inducir una respuesta superovulatoria repetible después de dos inyecciones intramusculares de FSH, sin afectar negativamente el número de embriones transferibles.

Agradecimientos

La investigación fue apoyada por el Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Bioniche Salud Animal, Belleville, ON y la Universidad de Saskatchewan.

Bibliografía

1. Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., Ginther, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94:177-188, 1992.

2. Adams, G.P., Kot, K., Smith, C.A., Ginther, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci* 30:259-271, 1993.
3. Adams, G.P., Nasser, L.F., Bó, G.A., Garcia, A., Del Campo, M.R., Mapletoft, R.J. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42:1103-1113, 1994.
4. Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Mahli, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69:72-80, 2008.
5. Baruselli, P.S., Sá Philo, M., Matins, C.M., Naser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., Bó, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos Indicus* cattle. *Theriogenology* 65: 77-88, 2006.
6. Bergfelt, D.R., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Adams, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod Sci* 49:1-12, 1997.
7. Bó, G.A., Hockley, D.K., Nasser, L.F., Mapletoft, R.J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42:963-975, 1994.
8. Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. Exogenous Control of Follicular Wave Emergence in Cattle. *Theriogenology* 43:31-40, 1995.
9. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Mapletoft, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72, 2002.
10. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P., Martins, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65:89-101, 2006.
11. Bó, G.A., Carballo Guerrero, D., Adams, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 69: 81-87, 2008.
12. Bó, G.A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., Mapletoft, R.J. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev* 22:106-112, 2010.
13. Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Bó, G.A. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 53:495, 2000.
14. Deyo, C.D., Colazo, M.G., Martinez, M.F., Mapletoft, R.J. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superovulation in cattle. *Theriogenology* 55:513, 2001.
15. García Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J., Mapletoft, R.J. Lengthening the superstimulatory treat-

- ment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 78:353-360, 2012.
16. Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J Reprod Fertil* 87:223-230, 1989.
 17. Hockley, D.K., Bó, G.A., Palasz, A.T., Del Campo, M.R., Mapletoft, R.J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37:224, 1992.
 18. Lane, E.A., Austin, E.J., Crowe, M.A. Estrus synchronization in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim Reprod Sci* 109:1-16, 2008.
 19. Laster, D.B. Disappearance of and uptake of 125I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 30: 407-415, 1972.
 20. Lovie, M., García, A., Hackett, A., Mapletoft, R.J. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in Holstein cows. *Theriogenology* 41:241, 1994.
 21. Macmillan, K.L., Thatcher, W.W. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 45:883-889, 1991.
 22. Mapletoft, R.J., Bennett-Steward, K., Adams, G.P. Recent Advances in the Superovulation of Cattle. *Reprod Nut Dev* 42:601-611, 2002.
 23. Mapletoft, R.J., Bó, G.A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24:278-283, 2012.
 24. Martinez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 57: 23-33, 1999.
 25. 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* 58:1713-1721, 2002.
 26. Nasser, L., Adams, G.P., Bó, G.A., Mapletoft, R.J.: Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40:713-724, 1993.
 27. Nasser, L.F., Sá Filho, M.F., Reis, E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327, 2011.
 28. Small, J.A., Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71:698-706, 2009.
 29. Steel, R.G., Hasler, J.F. Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 21: 246, 2009.
 30. Stobel, D.P., Moberg G.P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 65: 92-96, 1982.
 31. Sutherland, W. Biomaterials – Novel material from biological sources. Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, 1991, pp. 307-333.
 32. Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Alasino, R., Baltrano, D., Bianco, I., Mapletoft, R.J., Bó, G.A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 129:7-13, 2011.
 33. Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R.J., Bó, G. A. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77:1679-1685, 2012.
 34. Wock, J.M., Lyle, L.M., Hockett, M.E. 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* 20:228, 2008.