

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**SUPRESIÓN DEL EFECTO DE DOMINANCIA
FOLICULAR EN PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN
OVÁRICA EN GANADO OVINO MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS ÚNICA DE
ANTAGONISTA DE GnRH**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Cristina López Alonso

Bajo la dirección de los Doctores:

Antonio González de Bulnes López
María Teresa Encinas Cerezo

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2683-6



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

SUPRESIÓN DEL EFECTO DE DOMINANCIA FOLICULAR EN
PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN GANADO
OVINO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS
ÚNICA DE ANTAGONISTA DE GnRH

Cristina López Alonso

Madrid, 2004



La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable, pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón



Trabajo que presenta la licenciada Dña. Cristina López Alonso para aspirar al grado de Doctor en Veterinaria.

Fdo.: Cristina López Alonso

Madrid, septiembre de 2004



D. ANTONIO GONZÁLEZ DE BULNES LÓPEZ, Investigador del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agraria y Alimentaria y Dña. M^a TERESA ENCINAS CEREZO, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. Cristina López Alonso con el título: "Supresión del efecto de dominancia folicular en protocolos de estimulación ovárica en ganado ovino mediante la administración de una dosis única de antagonistas de GnRH" ha sido realizada bajo nuestra dirección en las dependencias del Departamento de Reproducción del INIA y del Departamento de Toxicología y Farmacología de la UCM.

Madrid, septiembre de 2004.

Fdo.: A. González de Bulnes López

Fdo.: M^a Teresa Encinas Cerezo



Índice

1.-INTRODUCCIÓN	25
Factores limitantes de la respuesta superovulatoria	26
Factores extrínsecos limitantes de la respuesta superovulatoria ..	26
Procedencia y pureza de la gonadotropina empleada	27
Protocolo de administración de gonadotropinas	27
Variabilidad asociada al uso de progestágenos	28
Factores intrínsecos limitantes de la respuesta superovulatoria ...	29
Factores genéticos	29
Edad	30
Estado nutricional	30
Estado reproductivo	30
Factores ováricos limitantes de la respuesta superovulatoria	32
Ciclo ovárico y dinámica folicular en la oveja	34
Fase de crecimiento folicular basal	36
Fase de crecimiento folicular tónico	37
Selección y dominancia folicular	38
Influencia del status ovárico en la respuesta a los tratamientos de superovulación	40
Bases fisiológico-farmacológicas del uso de análogos de GnRH	41
Incorporación de los fármacos antagonistas de GnRH a los protocolos de superovulación	47

2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL 53

Experimento I: Valoración de los efectos de la administración de dosis únicas (1,5 mg y 3,0 mg) del antagonista de GnRH Teverelix por vía subcutánea sobre la actividad hipofisaria y la funcionalidad folicular	57
Objetivo	57
Metodología	57
Protocolo experimental	57
Determinación de las concentraciones hormonales en plasma	59
Estudio morfométrico de los ovarios	60
Análisis de datos	61
Concentraciones plasmáticas de hormonas	61
Población folicular	61
Resultados	62
Perfiles de secreción de gonadotropinas hipofisarias	62
Dinámica de crecimiento y funcionalidad folicular.....	67
Experimento II: Valoración del efecto de la administración subcutánea de una dosis única de 1,5 mg de Teverelix sobre la respuesta endocrina y ovárica al tratamiento superovulatorio con FSH.....	71
Objetivo	71
Metodología	71
Protocolo experimental	71
Estudio morfométrico de los ovarios y determinación de las concentraciones hormonales en plasma	74
Detección de la aparición de la sintomatología de celo	75
Determinación de la respuesta ovulatoria	75
Recuperación y valoración de la viabilidad de los embriones	76
Análisis de datos	78
Población folicular	78
Concentraciones plasmáticas de hormonas	79
Índices de rendimiento superovulatorio	80
Resultados	81
Desarrollo folicular en respuesta a la administración de FSH	81
Aparición del celo y pico preovulatorio de LH	86
Respuesta superovulatoria	89



3.- DISCUSIÓN	91
4.- CONCLUSIONES	101
5.- RESUMEN Y SUMMARY.....	105
6.- BIBLIOGRAFÍA	115
7.- ANEXO	133



Agradecimientos



Agradecimientos

Ha llegado la parte de esta Memoria en la que sin duda alguna también hay que hacer un esfuerzo especial debido a dos motivos fundamentalmente; el primero de ellos porque sería una verdadera pena dejarse a alguien fuera de esta lista, el segundo, pero no menos importante, porque tengo la certeza absoluta que es la parte del trabajo que sin lugar a dudas todo el mundo lee, ¿acaso no lo cree así?; pues bien, si no está de acuerdo con esta afirmación, tómese la molestia de apuntar, aparte de las correspondientes a este apartado, cuantas páginas más es capaz de leer, al menos con el mismo interés que éstas (quedan por supuesto excluidos de esta afirmación todos los hombres y mujeres de ciencia que por motivos diversos están interesados en la reproducción, ovina por supuesto).

Siempre había oído decir que cuando uno llega a la parte de los agradecimientos el trabajo está listo para las correcciones de los últimos detalles y el trabajo de imprenta; pues bien, en mi caso no es así; tengo la sensación (y lo que es peor, también la certeza de no alejarme mucho de la realidad), de que lo más difícil está todavía por hacer. Entonces, si esto es así, ¿por qué ahora? La respuesta es simple, después de días de lectura de datos, de análisis estadísticos, de gráficos, de correcciones múltiples, creo que lo único que verdaderamente tengo claro en estos momentos es a quien debo agradecer que lo que hasta hoy me parece imposible vea, en espero no mucho tiempo, el final.

A Teresa y a Antonio, mis directores de Tesis, quiero agradecerles que me metieran en esto (aunque he de reconocer que ha habido más de un momento en el que no era exactamente ésta mi forma de pensar); gracias a ellos espero también poder salir.

A Teresa, agradecer su orden, su paciencia infinita conmigo (aventurada ya en la realización de mi Tesina, ha decidido no desdejar al refranero español y tropezar de nuevo en la misma piedra) en la no siempre fácil tarea de la dirección, sus excelentes habilidades investigadoras y sobre todo didácticas, su constancia en incluir algunas expresiones propias y en sustituir otras (obviamente propias de los demás), su ánimo y su constante apoyo (aún cuando casi todo estaba por hacer siempre decía que no quedaba casi nada), pero sobre todo, SU AMISTAD.

A Antonio, agradecer su inestimable ayuda, su apoyo, su comprensión y su gran labor de dirección. Tampoco me gustaría dejar de resaltar su conocimiento profundo sobre estos pequeños animalitos, de los que la mayoría de los mortales tan sólo conoce las excelencias de su carne (eso sí, cuando son pequeños) y las condiciones de extrema delicadeza en el lavado de las prendas procedentes de uno de sus productos más preciados (obviamente, todos ya saben que me estoy refiriendo a la lana). ¡Gracias por todo Antonio!

A los dos, agradecer las tardes y noches de frío, tubos de vacío, centrifugas, saltos (si quieren entender mejor el significado de esta palabra no les quedará más remedio que aventurarse en la espesura de los folios que encontrarán detrás), sueño, explicaciones, correcciones...; sin ellos, nada hubiera sido igual.

Toda la ayuda que Teresa y Antonio me han ofrecido no hubiera sido posible sin el apoyo de Andrés, M^a Angeles y Luis; para ellos también mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. D. Antonio R. Artalejo, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Madrid, agradecer que me haya permitido utilizar todos los medios de esta cátedra para la realización de este trabajo y también agradecer su ayuda y su ofrecimiento para cualquier cosa que pudiera necesitar. A todos los demás compañeros de farma, agradecer su interés y apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias agradecer que hayan puesto a nuestra disposición sus instalaciones y los medios necesarios para llevar a cabo toda la parte experimental de este trabajo.

A Rosa, a Almudena, a Chema y a Pedro, agradecerles que, junto con Teresa y Antonio, no hayan dudado en sacrificar noches de sueño y momentos de diversión para echarme una mano. A Almudena también me gustaría agradecerle toda su ayuda en el procesado de muestras.

A la Dra. M^a Jesús Cocero Oviedo quisiera agradecer su ayuda en los análisis de valoración de viabilidad embrionaria.

A todos los mozos del INIA, especialmente a Juan Carlos, agradecer su forma de cuidar los animales y sobre todo su ayuda en la no siempre fácil tarea de las ecografías (nadie como él sabe qué susurrar al oído de una oveja encima de una mesa para que se tranquilice).



A mis amigos Javier y Luis agradecer su continuo esfuerzo en facilitarme datos de contacto para poder hacer las determinaciones farmacocinéticas; aunque al final no pudo ser, gracias de todos modos.

A M^a José, a Juani, a Guzmán, a Azucena, a Olga y a Javier, agradecer que el aspecto de esta Tesis sea el que ven; ellos también han dedicado tiempo personal a ello y sobre todo mucho cariño.

Quien sin duda ha jugado un papel clave en este trabajo (y ciertamente no voluntario) han sido todas y cada una de las ovejas que, si cabe con más paciencia que mis directores, han soportado el trabajo previo necesario para la realización de esta Memoria; cada uno de los pinchazos (toma de muestras se llama científicamente aunque estoy segura que ellas lo describirían como pinchazos), cada ecografía, cada despertar en mitad de la noche, cada mirada nuestra durante los “actos más íntimos” (tanto ustedes como ellas saben perfectamente a lo que me refiero); todo lo han soportado con resignación sin decir ni Beeee!!!; a todas ellas gracias, ellas son las verdaderas protagonistas de esta historia (con final espero feliz).

A Hidal, Monter, Fages, Tere, Arthur, Starti, Alex y Ana, agradecer su paciencia y comprensión; después de noches en vela tomando muestras de sangre y practicando montas (las ovejas, claro), mi humor quizá no ha sido siempre todo lo bueno que ellos merecían.

A Fer, Mica, Javier, Olga, Pedro, Paloma, Olga, David, Alberto, Ana, agradecerles (aunque algunos no siempre supieron entender mi interés por meterme en este lío), su amistad; en todo momento supieron apoyarme y animarme (¡hasta accedieron a irse de vacaciones sin mí! y consintieron que algunas noches me retirara antes).

A Karlota, a Borja y a Mónica, agradecer sus elegantes paseos sobre el teclado del ordenador; sin ellos a veces, hubiera ido más deprisa pero aún así, gracias a los tres, se que sólo queriais ayudar en la medida que los buenos gatos sabéis y, sobre todo, queréis hacerlo.

A todos los que aunque no tengan oportunidad de leer esto dijeron que estaba loca, agradecer sus dudas; de las de muchos se sacan fuerzas para todo.

A Belén, gracias por no faltar nunca.

A mis padres, agradecerles... ¡TODO!, siempre están a mi lado; se la ilusión que les hace y con todo mi cariño les dedico a ellos este trabajo y todo el esfuerzo que me ha supuesto.

A otros muchos, cuyos nombres quizá no aparecen aquí pero que siempre se han interesado por la situación de este trabajo, gracias también.

Por último, quiero daros las gracias a todos los que en uno u otro momento habéis dejado cualquier otra cosa (probablemente más entretenida) para dedicar unos minutos a ojear estas hojas.



Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida por los Proyectos:

Factores sistémicos e intraováricos responsables de la selección del folículo ovulatorio y la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito en pequeños rumiantes. Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (2001-2006).

Estudio farmacocinético y farmacodinámico de los tratamientos con antagonistas de GnRH incorporados a protocolos de estimulación ovárica en ovejas. Financiado por la Universidad Complutense de Madrid (2004).





Introducción



Introducción

En pequeños rumiantes, como en otras especies, las técnicas de superovulación, conservación y transferencia de embriones constituyen en la actualidad una herramienta imprescindible tanto para el desarrollo de programas de conservación de recursos genéticos en razas con bajo número de efectivos, como para la aplicación de programas de mejora genética destinados a incrementar las producciones ganaderas.

En ambos casos, el objetivo de los protocolos de superovulación es el incremento de descendientes de las hembras seleccionadas mediante el aumento del número de ovulaciones y de embriones viables en respuesta a la utilización de tratamientos hormonales. Éstos incluyen generalmente la administración de un tratamiento con gonadotropinas -que permite la entrada en crecimiento de un mayor número de folículos- durante los últimos días del tratamiento de sincronización del celo y la administración de progestágenos intravaginales para sincronizar la ovulación.

La administración del tratamiento de superovulación con gonadotropinas tiene como objetivo el incremento del número de folículos que se desarrollan hasta el estadio de folículo preovulatorio. La administración de hormona folículo estimulante (FSH) cada 12 h, según los protocolos clásicos de superovulación, comienza a modificar la población folicular entre las 12 y las 24 h posteriores a la administración de la primera dosis. Estos cambios en la población folicular se relacionan con un aumento en el número total de folículos mayores o iguales a 2 mm, que crecen hasta los 5 mm de diámetro en 12-48 h, alcanzando el estadio preovulatorio a las 48-60 h (González-Bulnes *et al.* 2004a). Aunque el patrón de crecimiento folicular varía según la formulación de FSH utilizada y en función del protocolo de administración, los folículos ovulatorios obtenidos como resultado de los diferentes protocolos de superovulación se caracterizan por presentar un menor tamaño que los folículos ovulatorios de ciclos naturales, no estimulados con gonadotropinas (Driancourt *et al.* 1991). Esta disminución en el tamaño de los folículos ovulatorios se ha observado también durante los ciclos naturales en todas las razas de ovejas consideradas prolíficas, como Merino Boorola (McNatty *et al.* 1986), Chios (Avdi *et al.* 1997) y Romanov (Cahill *et al.* 1979).

En la fase folicular, inducida con la retirada de los progestágenos intravaginales, estos folículos entrarán en las fases de crecimiento y maduración finales y alcanzarán la ovulación. Así, a los 6 ó 7 días de haber retirado la esponja, y tras la monta o inseminación artificial, se pueden recuperar los embriones del útero y, previa valoración de su calidad, transferirlos a hembras receptoras, bien en fresco o tras un periodo de conservación variable.

Sin embargo, y a pesar de las mejoras conseguidas durante los últimos años en cuanto a la eficacia de los protocolos de superovulación, los rendimientos de estas técnicas presentan una gran variabilidad; no sólo entre los diferentes grupos de tratamiento, sino también entre animales de un mismo grupo. Han sido diversos los estudios que se han llevado a cabo para averiguar las causas de esta variabilidad – factores limitantes – y poder así, en base a estos conocimientos, optimizar los protocolos utilizados.

Factores limitantes de la respuesta superovulatoria

La elevada variabilidad en la tasa de ovulación y en el número de embriones viables obtenidos en respuesta a los tratamientos de superovulación se ha relacionado clásicamente con factores limitantes tanto extrínsecos -procedencia, pureza y protocolo de administración de las gonadotropinas- como intrínsecos -raza, edad, y estados nutricional y reproductivo- del animal.

Factores Extrínsecos Limitantes de la Respuesta Superovulatoria

Como se ha descrito anteriormente, los tratamientos de superovulación estimulan el crecimiento de un elevado número de folículos mediante la administración de altas cantidades de gonadotropinas exógenas. Este aporte de gonadotropinas es necesario para conseguir la respuesta superovulatoria, pero puede dar lugar a ciertos efectos adversos. Así, la respuesta a los tratamientos de superovulación en ovejas, al igual que en otras especies de rumiantes, se asocia con una elevada incidencia de alteraciones en el desarrollo folicular, la maduración del oocito y los mecanismos ovulatorios (Kafi y McGowan, 1997). Algunas de estas alteraciones son comunes a todos los tratamientos de superovulación pero hay otros factores, como el origen de la preparación comercial de gonatropina, su pureza y el protocolo de administración, que influyen en la respuesta final.



Por otra parte, los progestágenos -utilizados de forma paralela a los tratamientos superovulatorios en pequeños rumiantes para la sincronización de la ovulación en todos los animales del grupo, tanto hembras donantes como hembras receptoras-, pueden también ejercer efectos secundarios sobre la respuesta ovárica, la fertilización y la viabilidad embrionaria.

Procedencia y pureza de la gonadotropina empleada

Los preparados comerciales de gonadotropinas se componen mayoritariamente de hormona folículo estimulante (FSH), pero contienen también un pequeño porcentaje de hormona luteinizante (LH) que puede variar entre los diferentes preparados farmacéuticos (Lindsell *et al.* 1986b), e incluso entre distintos lotes (Wollen *et al.* 1985), modificando de manera importante la respuesta obtenida tras su administración.

Si bien es necesaria una concentración mínima de LH para que se produzca la ovulación, elevadas concentraciones de esta hormona durante periodos de tiempo prolongados previos a la descarga endógena preovulatoria pueden producir alteraciones tanto en el momento de presentación y en la amplitud de este pico preovulatorio de LH (Taft *et al.* 1996) como en la capacidad de los folículos para ovular (Rubianes *et al.* 1995). Así, se ha observado que un elevado contenido en LH disminuye los rendimientos de los protocolos superovulatorios debido a que gran parte de los folículos que se desarrollan en respuesta al tratamiento entran en atresia a lo largo de su crecimiento o no son capaces de alcanzar la ovulación (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2000).

Como consecuencia, parecería razonable la utilización de preparaciones de FSH altamente purificada, aunque algunos autores sostienen que niveles excesivamente bajos de LH también inducen alteraciones en la respuesta superovulatoria, por lo que proponen la administración de cantidades conocidas de LH al final del tratamiento superovulatorio con FSH pura (Picton *et al.* 1990; Cognie, 1999).

Protocolo de administración de gonadotropinas

El protocolo de administración utilizado (en lo que se refiere a número de dosificaciones, dosis constantes vs decrecientes y periodos inter-dosis) es otro de los factores que también pueden influir sobre la variabilidad de la respuesta (Hoffman *et al.* 1988); así, desde los primeros

años de la década de 1990 se conoce cómo el número de administraciones modifica los resultados del tratamiento con FSH (López Sebastián *et al.* 1990; Rexroad y Powell, 1991).

En la actualidad, los laboratorios que han desarrollado los compuestos comerciales purificados recomiendan, para simplificar el manejo, la administración de dosis constantes. Sin embargo, existe una controversia entre los autores que señalan mejores rendimientos en animales tratados con dosis constantes (Berlinguer *et al.* 2004) y los autores que defienden el uso de dosis decrecientes (González-Bulnes *et al.* 2004a). Parece ser que el número de embriones viables recuperados *in vivo* es mayor cuando se utilizan dosis decrecientes, hecho probablemente debido a la mayor similitud de esta pauta con el patrón fisiológico de secreción de FSH durante la fase folicular.

Variabilidad asociada al uso de progestágenos

La administración de progestágenos disminuye la secreción de LH (Goodman y Karsh, 1980) y, mantenida durante 14 días, como es el caso de las ovejas sometidas a tratamientos de sincronización de celos, asegura, en el momento de la retirada, la aparición espontánea de la luteolisis, la aparición del celo, la descarga preovulatoria de LH y la ovulación de una forma controlada e independiente del momento del ciclo en el que se administren (Robinson, 1967). Sin embargo, estos tratamientos se han identificado como agentes causales de alteraciones, tanto a nivel sistémico como a nivel ovárico (Scaramuzzi *et al.* 1988), en la liberación de LH y en los patrones normales de crecimiento folicular y dominancia (Nöel *et al.* 1994).

La máxima concentración plasmática de progestágeno se alcanza 48 h después de su administración intravaginal (Robinson, 1965), período tras el cual disminuye hasta concentraciones bajas, incluso insuficientes para estimular la actividad del cuerpo lúteo al final del tratamiento (Robinson, 1967). Esta situación parece ser la responsable de la gran variabilidad en cuanto a aparición del celo, pico de LH y aparición de la ovulación dentro de animales del mismo grupo de tratamiento (Gaston-Parry *et al.* 1988) permitiendo la persistencia de folículos de tamaño preovulatorio envejecidos incapaces de ovular o que provocan un descenso en el índice de fertilidad si alcanzan la ovulación (Johnson *et al.* 1996; Ungerfeld and Rubianes, 1999; Viñoles *et al.* 2001). Por otro lado, las alteraciones en la descarga preovulatoria de LH y la ovulación



pueden agravarse en el caso de que un cuerpo lúteo persista más allá del periodo de inserción del progestágeno.

Para evitar estos inconvenientes, se han descrito protocolos de superovulación que incluyen la administración de una segunda dosis de progestágeno a mitad del tratamiento, acompañado de la administración por vía i.m. de un análogo de prostaglandina, responsable de inducir la luteolisis antes de la retirada del progestágeno (Dingwall *et al.* 1994; Gonzalez-Bulnes *et al.* 2002b). La utilización de este protocolo ha supuesto un aumento significativo de la tasa de ovulación, así como del número total de embriones viables recogidos; aunque persiste una alta variabilidad de resultados.

Factores Intrínsecos Limitantes de la Respuesta Superovulatoria

A pesar de las mejoras en los protocolos hormonales, la persistencia de una alta variabilidad en los rendimientos, entre grupos y entre individuos pertenecientes al mismo grupo de tratamiento, parece indicar la existencia de otros factores, que podemos denominar intrínsecos, que influyen en el número final de embriones y en la viabilidad de los mismos. Los estudios realizados por diferentes autores señalan la raza, edad, y estados nutricional y reproductivo como los más importantes.

Factores Genéticos

Bindon *et al.* (1986) estudiaron el papel de los factores genéticos en la variabilidad ovulatoria; en principio, las razas más prolíficas presentan mejores respuestas a los tratamientos superovulatorios que aquellas con menor índice de prolificidad (Nutti *et al.* 1987; Dufour *et al.* 2000).

Los tratamientos no presentan la misma eficacia incluso dentro de los individuos genéticamente iguales (Wiemer *et al.* 1986), si bien, estas diferencias interindividuales son menos evidentes en razas no prolíficas (Kiessling *et al.* 1986; Picazo *et al.* 1996).

Edad

Tanto la ovulación inducida hormonalmente dentro de los protocolos de superovulación como la no inducida durante los ciclos naturales, están claramente influidas por la edad de la hembra (Theriez *et al.* 1971). Así, en la especie ovina, los mejores resultados en cuanto a recogida de embriones se obtienen en hembras de alrededor de 6 años de edad (Torres *et al.* 1987).

Estudios realizados en ganado vacuno indican que esta disminución en la respuesta superovulatoria se relaciona directamente con el descenso en el número de folículos capaces de responder al tratamiento con gonadotropinas (Lerner *et al.* 1986).

Estado Nutricional

Una nutrición inadecuada, ya sea en hembras sometidas a regímenes nutritivos excesivamente altos (Lozano *et al.* 2003) o a regímenes nutritivamente deficientes, puede comprometer la competencia del oocito (O'Callaghan *et al.* 2000), la función luteal (Jabbour *et al.* 1991) y el desarrollo embrionario (Abecia *et al.* 1997).

Por otra parte, en ganado vacuno se ha indicado que las deficiencias alimentarias pueden producir diversas alteraciones en la secreción hormonal a nivel hipotalámico, adenohipofisario u ovárico (Schillo, 1992) con posible incidencia en los resultados de tratamientos superovulatorios.

Estado reproductivo

El estado reproductivo de las hembras en el momento de someterse a los tratamientos de superovulación y, de forma especial, los periodos de anestro característicos en la especie ovina, tienen un papel clave en los resultados obtenidos de los mismos.

La influencia del anestro prepuberal estaría muy relacionada con la de otros factores como la edad. Los animales en anestro prepúber pueden responder con ovulaciones a la administración de gonadotropinas exógenas puesto que sus folículos son ya sensibles a la LH (Driancourt *et al.* 1990), si bien el índice de ovulación es inferior al que se obtiene en ovejas adultas (Driancourt y Avdi, 1993).



En épocas de anestro estacional, la influencia de la estación y el fotoperiodo es evidente en razas características de altas latitudes (Gherardi y Lindsay, 1980), afectando principalmente a la viabilidad de los embriones (Mitchell *et al.* 2002a,b). En zonas templadas no se han descrito diferencias en la respuesta a los tratamientos realizados en las épocas de actividad reproductiva o en épocas de anestro (Baril and Vallet, 1990; López-Sebastián *et al.* 1990; Samartzi *et al.* 1995; González-Bulnes *et al.* 2003a, 2003b).

El anestro postparto puede también limitar la respuesta ovárica a tratamientos inductores de la ovulación mediante gonadotropinas exógenas (Driancourt y Avdi, 1993). El estudio de los perfiles endocrinos durante el postparto y de la respuesta a los diferentes tratamientos hormonales, ha permitido establecer una fase de inactividad ovulatoria más intensa que se corresponde con el postparto temprano (Wise, 1990), de unos 21 días de duración, y una segunda fase de duración variable, determinada principalmente por la lactación (Schirar *et al.* 1989).

La inactividad ovulatoria durante el postparto temprano está asociada a la incapacidad de generar pulsos de LH con una frecuencia igual a la observada durante la fase folicular del ciclo estral. Además, durante esta primera fase es característica la falta de respuesta de la hipófisis anterior a la administración exógena de GnRH (Wise *et al.* 1986). La inactividad durante el periodo de lactación puede deberse a un desequilibrio entre el consumo energético y el requerido para la producción de leche, hecho observado en ganado vacuno al inicio de la lactación (Coppock *et al.* 1974; Sejrsen y Neimann, 1982). Este desequilibrio metabólico, similar al que tiene lugar en estados de desnutrición, parece alterar la secreción pulsátil de LH (Butler y Smith, 1989) y justificaría la disminución de la actividad ovárica.

Todos estos condicionantes son considerados en la elaboración de los protocolos de superovulación, con el fin de minimizar los efectos indeseados. Sin embargo, y a pesar de ello y de las mejoras introducidas en la selección y el manejo de los animales, los rendimientos de las técnicas de superovulación en pequeños rumiantes siguen presentando una gran variabilidad, hecho que ha conducido a la hipótesis de establecer los factores ováricos como punto clave y responsable de esta variación residual.

Factores ováricos limitantes de la respuesta superovulatoria

En las hembras de los animales mamíferos, la actividad reproductiva se inicia con la aparición de la pubertad; a partir de este momento se desarrolla la capacidad para producir gametos femeninos de forma cíclica, coincidiendo con los períodos de receptividad sexual. Estos ciclos se mantienen durante todo el período de vida reproductiva del animal a excepción de los períodos de anestro propios de cada especie (Saumande, 1991).

En la oveja, los ciclos sexuales se establecen cada 17 días como media y durante ellos se producen de forma continua los procesos de crecimiento y desarrollo folicular que tienen como objetivo la forma-

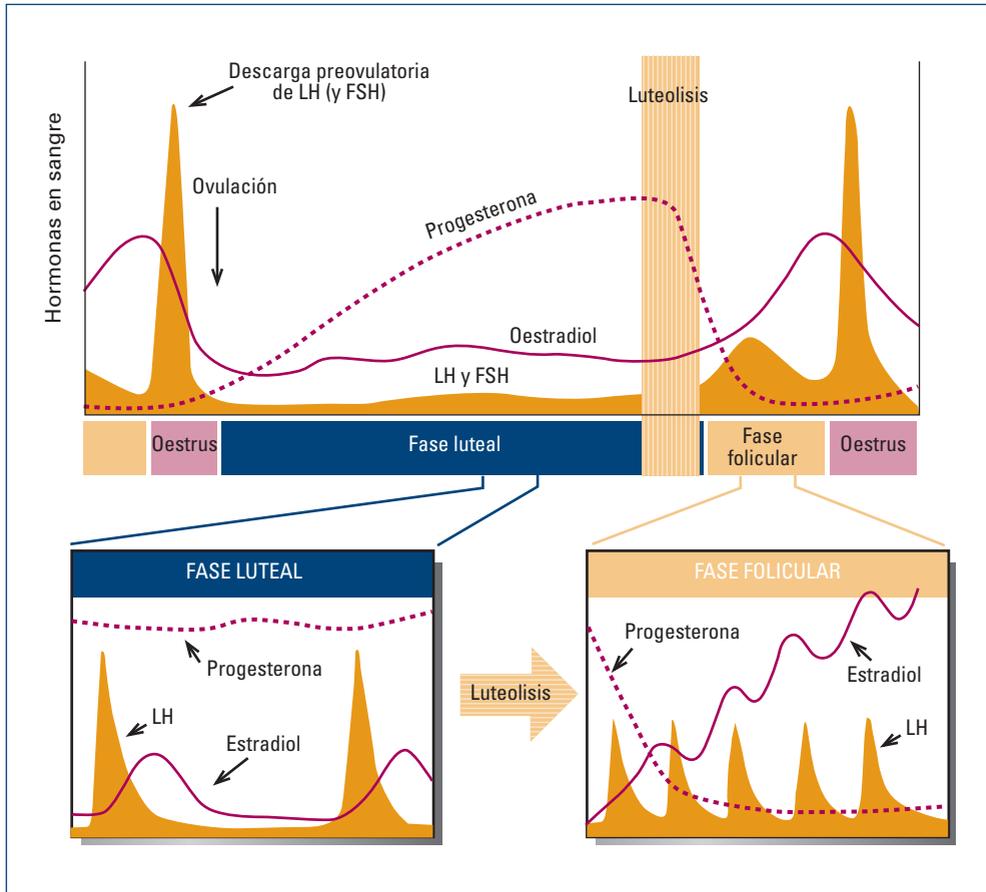


Figura 1.1. Representación esquemática de los cambios hormonales en las diferentes fases del ciclo sexual (Adaptado de Martin y Thomas, 1990).

ción y liberación de gametos maduros. En el ciclo sexual de la oveja podemos distinguir una Fase Folicular, con una duración de 2-3 días, de los cuales las 30-36 h previas a la ovulación son de receptividad sexual, y una Fase Lutéica que dura 14-15 días y que se corresponde con la etapa de formación del cuerpo lúteo y el posterior desarrollo de su actividad progesterónica.

Todos estos procesos son regulados por la actividad de los diferentes órganos que constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (hipotálamo, hipófisis, ovario y útero); las hormonas se secretan en respuesta a mecanismos de estimulación e inhibición por feed-back y son distribuidas por el torrente circulatorio hasta los órganos diana.

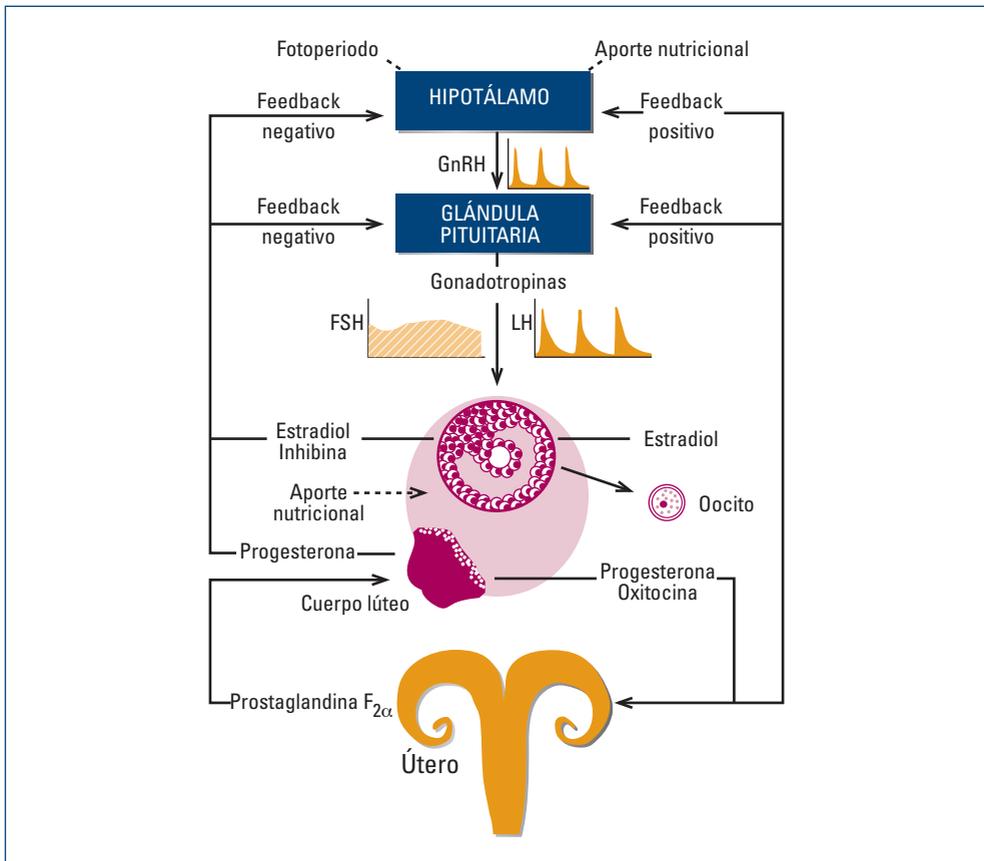


Figura 1.2. Representación esquemática del eje hipotálamo hipotálamo-hipófisis-gonadal (Adaptado de Baird, 1983).

Ciclo Ovárico y Dinámica Folicular en la Oveja

La tasa de ovulación es un parámetro característico de cada especie y está condicionado por factores de carácter genético. En la especie ovina, la tasa de ovulación es muy reducida, con pequeñas variaciones dependiendo de la raza. El número de ovulaciones durante un ciclo sexual está relacionado con el número de folículos que se desarrollan desde el estadio de folículo primordial hasta el estadio de preovulatorio. La dinámica de crecimiento de estos folículos está controlada por el equilibrio entre los mecanismos de estimulación e inhibición del crecimiento folicular, que pueden actuar tanto a nivel sistémico como intraovárico.

Los factores sistémicos hacen referencia a las hormonas secretadas al torrente circulatorio por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario entre las cuales, las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) presentan acción estimulante, y el estradiol y la inhibina, actividad inhibidora. Los factores intraováricos se originan en el ovario y, sin alcanzar la circulación sistémica, actúan sobre este mismo órgano; pueden ser estimulantes, como el Factor de Crecimiento de tipo Insulínico (IGF, Insulin-like Growth Factor) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor) o inhibidores, como el estradiol y la inhibina.

En la especie ovina, el proceso de foliculogénesis o de crecimiento y desarrollo de folículos ováricos desde el estadio de folículo primordial a folículo preovulatorio ha sido objeto de numerosos estudios y revisiones bibliográficas (Driancourt, 1991; Mariana *et al.* 1991; Picazo y López Sebastián, 1995). Clásicamente, la descripción de cada una de las etapas por las que atraviesa un folículo en su desarrollo se ha basado en los cambios morfológicos, íntimamente relacionados con algunas características funcionales de cada estadio. Actualmente, los estadios de los folículos se definen, de forma consensuada, atendiendo principalmente a criterios funcionales y más concretamente, a la capacidad de respuesta y grado de dependencia folicular a la secreción de gonadotropinas FSH y LH (Scaramuzzi *et al.* 1993).

El proceso denominado foliculogénesis se caracteriza por el desarrollo simultáneo de subpoblaciones de folículos con características funcionales diferentes según su capacidad de respuesta y grado de dependencia del aporte de gonadotropinas hipofisarias. Desde el punto de vista funcional, la primera fase de crecimiento transcurre desde la

etapa de folículo primordial a folículo con capacidad de respuesta a las gonadotropinas o folículo preantral; en ella tienen lugar, por primera vez, fenómenos de proliferación celular en la granulosa y la aparición de receptores de FSH y LH en la granulosa y en la teca, respectivamente. La segunda fase está caracterizada por una intensa proliferación y diferenciación celular y por la adquisición de actividad esteroidogénica plena, dando lugar a folículos que dependen absolutamente del aporte gonadotrópico. Esta segunda etapa es también conocida como fase de reclutamiento folicular y da paso al estadio de selección folicular, al final del cual surge un folículo dominante destinado a la ovulación (Driancourt *et al.* 1987).

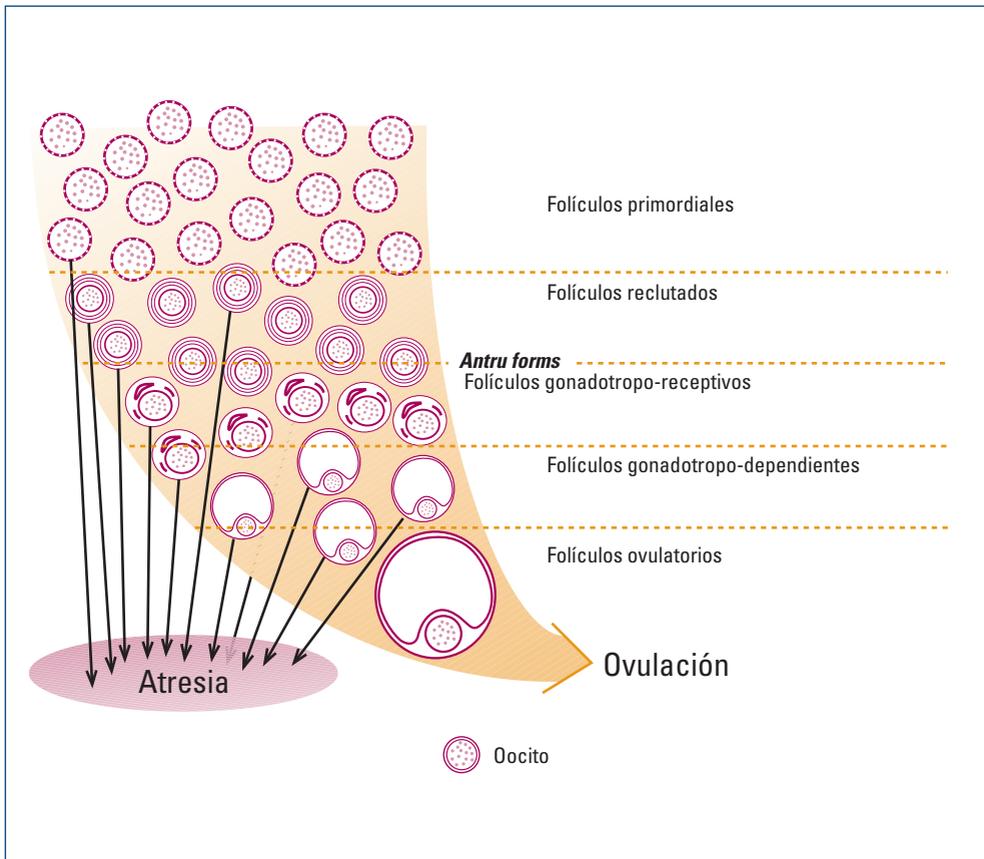


Figura 1.3. Representación esquemática de las principales fases del desarrollo folicular (Adaptado de Driancourt, 2003).

Fase de crecimiento folicular basal (De folículo primordial a folículo preantral, con capacidad de respuesta a las gonadotropinas)

En la mayoría de los mamíferos, las oogonias alcanzan la fase de oocito primario durante el desarrollo fetal; luego permanecen en profase meiótica constituyendo un “pool” o reserva de folículos primordiales que accederán a la etapa de crecimiento a lo largo de la vida reproductiva. En el ovario del feto ovino existen folículos desde el día 70 de la gestación, estando completa la dotación folicular (40.000-300.000 folículos) en el momento del nacimiento (Cahill *et al.* 1979). En el desarrollo prepuberal se produce una fuerte reducción, de forma que en las ovejas adultas hay, con pequeñas variaciones según la raza, entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales y entre 100 y 400 en crecimiento, de los cuales sólo unos 10-40 son visibles en la superficie ovárica (Rubianes, 2000).

El folículo primordial está estructuralmente constituido por el oocito, desprovisto de zona pelúcida y rodeado de un estrato de células epiteliales planas precursoras de las células de la granulosa, y de una lámina basal externa. En la oveja, como sucede en otras especies (Peters *et al.* 1973), el inicio del crecimiento del folículo primordial no es sólo independiente de la FSH y LH (Mc Natty *et al.* 1992), sino que al parecer es desencadenado por el propio oocito (Reddoch *et al.* 1986; Eppig *et al.* 2002). Éste experimenta un incremento en la síntesis de ARN y de ciertas proteínas, algunas de las cuales están destinadas a formar la zona pelúcida, e induce la primera diferenciación y proliferación de las células epiteliales que lo rodean (pre-granulosa), transformándose éstas en células cúbicas (granulosa), como se describe en el trabajo de Lintern-Moore y Moore (1979).

Este crecimiento folicular está influido por dos hormonas intraováricas, el estradiol (Hisaw, 1974) y la testosterona (Schreiber y Ross, 1976) -para las que aparecen receptores en fases muy tempranas-, así como por el Factor de Crecimiento de tipo Insulínico y el Factor de Crecimiento Epidérmico (Driancourt, 1991). En esta fase tiene también lugar la diferenciación de las células tecales que se sitúan concéntricas a la lámina basal. Simultáneamente se expresan los primeros receptores de FSH y LH en las células de la granulosa (Peluso *et al.* 1991; McNatty *et al.* 1992) y de la teca (Erickson y Magoffin, 1983) respectivamente, aún en ausencia de estas gonadotropinas.



Los folículos resultantes, conocidos como primarios –o preantrales, por la ausencia de cavidad o “antrum”-, tienen un diámetro aproximado de 0,1mm y permanecen en reserva hasta la pubertad (Faddy *et al.* 1976).

Fase de crecimiento folicular tónico o de reclutamiento folicular (De folículo preantral a folículo antral, dependiente de gonadotropinas)

Una vez que el folículo primario está completamente desarrollado y posee teca interna se encuentra expuesto al medio hormonal del plasma periférico; así, su desarrollo posterior es dependiente de factores extraováricos, principalmente FSH (Driancourt *et al.* 1987). Los requerimientos en gonadotropinas de los folículos primarios para iniciar esta fase de crecimiento son hasta el momento desconocidos, pero se ha observado que la retirada de estas hormonas por hipofisectomía resulta en un fallo en la formación de folículos antrales. En estas circunstancias, el folículo entra en el proceso de reclutamiento; durante éste se produce la diferenciación del folículo secundario, que, por definición, es todo folículo con un antrum o cavidad rellena de líquido. Según Cahill y Mauleon (1980), los folículos comienzan a formar el antrum cuando alcanzan un tamaño de 0,2 mm de diámetro; al principio el incremento de tamaño es lento, pero entre los 0,5 y 2 mm se transforma en un proceso muy rápido que dura aproximadamente 5 días y que se debe casi exclusivamente a la acumulación de líquido folicular en dicho antrum.

La FSH actúa, además, induciendo la formación de receptores para LH en las células de la granulosa (Richards y Migley, 1976), prolactina y prostaglandinas, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 (Erickson, 1978). Las células de la granulosa comienzan a expresar receptores para LH en el estadio de folículo secundario y su número y sensibilidad van aumentando desde que aparecen, en el folículo de 2,5 mm (McNeilly *et al.* 1986), hasta ser máximos en el folículo preovulatorio.

Los folículos de mayor tamaño que han entrado en el proceso de reclutamiento comienzan a secretar elevadas cantidades de estradiol e inhibina que inducen, a nivel hipofisario, una disminución en la secreción de FSH. La liberación folicular de estrógenos se produce por un mecanismo en el que intervienen tanto la capa granulosa como la teca interna (Ryan *et al.* 1968) estimuladas por las gonadotropinas séricas (Armstrong y Papkoff, 1976). Las células de la teca interna, inducidas por la acción de

la LH, se diferencian (Fortune *et al.* 1988) y secretan andrógenos, principalmente androstenodiona (Erickson y Ryan, 1976). Las células de la granulosa convierten los andrógenos en estrógenos por medio de la actividad aromatasa, capacidad enzimática adquirida por acción de la FSH.

Fase de Selección y dominancia folicular (De folículo dependiente de gonadotropinas a folículo dominante)

Es durante esta fase cuando tiene lugar la selección de los folículos ovulatorios.

En la fase folicular del ciclo, el incremento de las concentraciones de estrógenos e inhibina ejerce un efecto de *feed-back* negativo sobre la hipófisis y, como consecuencia, disminuye progresivamente la secreción de FSH hasta que las concentraciones plasmáticas descienden por debajo del umbral necesario para el mantenimiento de otros folículos dependientes de gonadotropinas (Martin *et al.* 1988). Así, al final de la fase folicular, del total de folículos susceptibles de ser reclutados, tan sólo aquellos capaces de soportar las bajas concentraciones de FSH son capaces de continuar su desarrollo entrando en la fase de selección que conduce a la diferenciación de un folículo terciario susceptible de ovular; el resto, incapaz de soportar la limitación en el aporte de FSH, entra en atresia. Existe un umbral de estimulación con FSH por encima del cual tienen lugar las últimas fases del desarrollo folicular; si la concentración mínima de FSH requerida no está presente éstas no se producen. Este umbral de sensibilidad es distinto para cada individuo, lo que explicaría la enorme variabilidad en la tasa de ovulación en respuesta a los tratamientos de superovulación (Picton y McNeilly, 1991).

Al parecer, el comienzo del mecanismo de selección requiere una inducción inicial crítica de la actividad aromatasa y capacidad de respuesta a la LH. De esta manera, cuando se alcanza el umbral de FSH en un folículo (Hillier *et al.* 1988) éste será el primero en aromatizar andrógenos tecales y en producir estrógenos, que sensibilizan localmente a las células de su propia granulosa al efecto de la FSH, confiriendo al folículo destinado a ser dominante o/y ovulatorio una sensibilidad más elevada a la FSH (Henderson *et al.* 1987) que le permite mantenerse con niveles inferiores de esta hormona.

Además, durante esta fase, los folículos dominantes cambian sus necesidades de FSH hacia LH, en respuesta a la cual crecen y maduran



hasta alcanzar el estadio preovulatorio. El folículo terciario tiene un elevado grado de desarrollo tanto de la teca como de la granulosa, y gran cantidad de receptores para LH en ambas (Webb y England, 1982); estos receptores responden al incremento de los pulsos de LH durante esta fase, que termina en el proceso de ovulación en caso de producirse la descarga preovulatoria de LH tras la luteolisis (Cumming *et al.* 1971).

Esta dependencia de la LH para el establecimiento de la dominancia explica el hecho de que durante la fase luteal, los folículos preovulatorios no tengan oportunidad de establecer dominancia; el cuerpo lúteo secreta progesterona, cuyo efecto inhibitorio sobre la hipófisis mantiene una baja frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. Cuando se destruye el cuerpo lúteo y comienza una nueva fase folicular, los niveles de progesterona descienden y se eleva la producción de LH pudiendo llegar a establecerse la dominancia.

Además, el mecanismo de selección folicular en la oveja, al igual que en otras especies monovulatorias, podría operar mediante activación de factores intraováricos que limitan la viabilidad de folículos vecinos y el número de folículos antrales (Cahill *et al.* 1985).

Zeleznik y Hillier (1984) describieron las características que presenta el folículo dominante y que le dan esta categoría sobre el resto; los folículos de gran tamaño tienen una mayor actividad aromatasa y producen gran cantidad de estrógenos; además, producen inhibina que, junto con los estrógenos, actúa sobre la hipófisis disminuyendo la secreción de FSH (McNeilly, 1984). Los folículos en menor grado de desarrollo, en presencia de un folículo grande (Martin *et al.* 1988) carecen, por tanto, de concentraciones suficientes de FSH. En ese momento todavía no disponen de receptores de LH suficientes como para utilizar esta hormona; únicamente aquellos folículos antrales (2-4 mm) con elevada actividad aromatasa, son capaces de mantener un medio altamente estrogénico.

Influencia del status ovárico en la respuesta a los tratamientos de superovulación

Uno de los factores que más influyen sobre la respuesta individual a los tratamientos de superovulación es la población folicular de cada oveja al comienzo del tratamiento. Así, la respuesta ovárica está directamente relacionada con el número de folículos pequeños (2-3 mm), que han alcanzado el estadio de gonadotropo-receptivos y son capaces de crecer hasta el tamaño preovulatorio en respuesta al estímulo exógeno con FSH (González-Bulnes *et al.* 2002b); un número mayor de estos folículos eleva la tasa de ovulación y el número de embriones, independientemente del tipo de gonadotropina utilizada (González-Bulnes *et al.* 2000).

Sin embargo, la presencia de folículos de gran tamaño o dominantes antes de la estimulación ovárica se relaciona negativamente con la respuesta obtenida al tratamiento ya que, si bien la presencia de un folículo dominante al inicio de un tratamiento con FSH no parece afectar significativamente a la tasa de ovulación (González-Bulnes *et al.* 2000), sí se ha relacionado con un menor número y calidad de los embriones obtenidos (González-Bulnes *et al.* 2002b).

De los resultados de estos estudios se ha podido concluir que la situación ovárica ideal en el momento de iniciar los tratamientos de superovulación consistiría en una población folicular formada por el mayor número posible de folículos con un tamaño aproximado de 2-3 mm, sin actividad estrogénica y con buena capacidad de respuesta frente a las gonadotropinas.

La eliminación de folículos dominantes se convierte, por tanto, en uno de los principales objetivos de cualquiera de los diferentes protocolos de actuación que, en reproducción animal, tenga como objetivo incrementar el número de embriones viables recogidos de una hembra.

La ablación quirúrgica de los folículos dominantes ha demostrado buenos resultados en ganado vacuno, habiéndose observado en algunos estudios que esta práctica, realizada mediante punción guiada por ultrasonografía, tiene como consecuencia un aumento significativo de los rendimientos superovulatorios en respuesta al tratamiento con FSH (Bungartz y Niemman, 1994). En ovejas también se ha observado la efi-



cacia de esta técnica (González-Bulnes *et al.* 2002a), pero debido al pequeño tamaño corporal y a las características del tracto genital de los pequeños rumiantes, su aplicación requiere la utilización de técnicas de laparoscopia lo que aumenta significativamente los inconvenientes derivados del manejo de los animales.

Por este motivo, los tratamientos farmacológicos se convierten en la alternativa de elección para ser utilizados de forma rutinaria. Debido a que, como hemos visto, la dominancia se establece en presencia de altas concentraciones de LH (Campbell *et al.* 1995; Adams, 1999), la forma más directa de mejorar los resultados de las técnicas de superovulación en pequeños rumiantes parece ser la inducción de bajas concentraciones de LH previas a la estimulación con FSH. En esta situación, con bajas concentraciones de LH, los folículos grandes se vuelven dependientes de la FSH y no pueden llegar, por tanto, a establecer la dominancia. La disminución eficaz de la liberación de LH puede conseguirse mediante el control de la actividad de la GnRH, hormona reguladora de la producción y secreción de gonadotropinas a nivel de las células de la hipófisis; esta hormona controla las concentraciones tanto de LH como de FSH, ambas piezas clave en el mantenimiento del control hormonal sexual y de la función reproductiva normal de las gónadas.

Bases fisiio-farmacológicas del uso de analogos de GnRH

La hormona liberadora de gonadotropina tipo I (GnRH-I), fue descubierta en el año 1967 y es considerada el factor neuroendocrino reproductivo clásico (Huirne y Lambalk, 2001).

En 1984, Miyamoto *et al.* aislaron una GnRH-II en el hipotálamo de pollo, idéntica estructuralmente a la GnRH-I en un 70% y de distribución más amplia. En 1996, Kasten *et al.* confirmaron la existencia de este segundo decapeptido en las especies de animales mamíferos, incluyendo los primates; se cree que su función en estas especies podría estar relacionada con la secreción de gonadotropinas, si bien todavía no se conoce su actividad concreta (Neill, 2002).

La secreción de GnRH por parte de las neuronas hipotalámicas se desarrolla de acuerdo a un patrón establecido a lo largo de la vida del animal: durante el periodo neonatal se encuentra activo de forma transitoria, en reposo durante la fase prepuberal y durante la pubertad

alcanza los niveles de actividad que se mantendrán durante la vida adulta. Este decapeptido, caracterizado en 1971 por Schally *et al* se sintetiza en el citoplasma de las neuronas hipotalámicas presentes en la eminencia media del hipotálamo, se almacena en forma de gránulos en el aparato de Golgi y así se transporta a lo largo del axón hasta ser liberado a modo de pulsos (Huirne y Lambalk, 2001; Coccia *et al.* 2004).

En la hormona liberadora de gonadotropina, los aminoácidos responsables de las funciones claves se localizan en las posiciones 1, 2, 3, 6 y 10, siendo los correspondientes a las posiciones 2 y 3 los responsables de la liberación de gonadotropinas (Coccia *et al.* 2004).

De manera fisiológica, la señal enviada desde el hipotálamo a la hipófisis mediante pulsos de GnRH tiene un carácter episódico; se produce cada 1-4 h y asegura así la síntesis y liberación de FSH y LH. La GnRH llega a la hipófisis a través del sistema portal hipotálamo-hipófisis y a otros órganos, casi siempre relacionados con la reproducción, a través de la circulación sistémica. En todos estos órganos existen receptores específicos para GnRH (GnRHr) que se encargan de desarrollar una actividad fisiológica en respuesta al estímulo hormonal.

Dentro de los receptores de GnRH podemos distinguir dos tipos que, aunque pertenecen a la misma familia (receptores acoplados a proteína G) y son estructuralmente idénticos en un 41%, proceden de la expresión de dos genes diferentes. Así, el gen para el receptor de GnRH tipo I se localiza en el cromosoma 4 (rq 21.2) y el gen para el receptor de GnRH tipo II se localiza en el cromosoma 1q.

En mamíferos, el receptor GnRH tipo II está más ampliamente distribuido que el receptor GnRH tipo I pudiéndose encontrar en el cerebro, mayoritariamente en la pituitaria y en áreas asociadas con la excitación sexual, así como en diferentes tejidos no neurales y reproductivos, lo que hace pensar en cierta diversidad de funciones (Huirne y Lambalk, 2001; Neill, 2002).

Los receptores de esta familia están formados por una cadena polipeptídica única, dispuesta en 7 α -hélices transmembrana, con dominios intra y extracelulares. El tercer bucle intracelular del receptor es mayor que el resto e interacciona con la proteína G. El dominio de fijación del ligando está inmerso en el espesor de la membrana, sobre uno o más de los segmentos α -helicoidales. Ambos tipos de GnRHr se dife-

rencian en que el de tipo I tiene 328 aminoácidos careciendo de cola citoplásmica carboxyl-terminal, mientras el receptor para GnRH tipo II sí posee esta cola C-terminal, que se cree juega un papel clave en los procesos de desensibilización rápida.

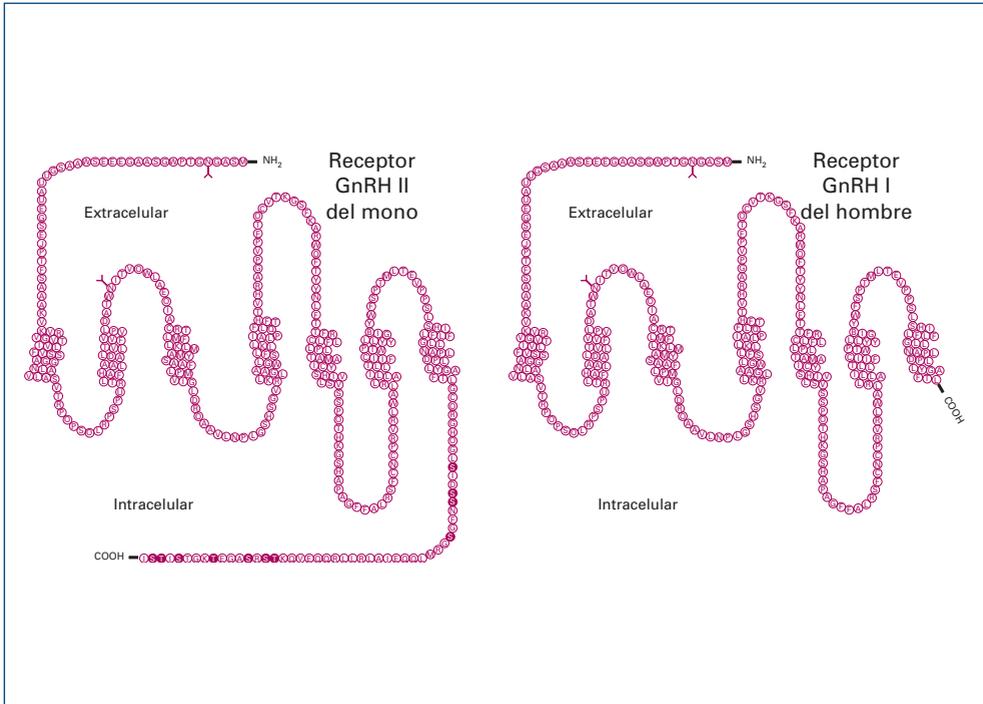


Figura 1.4. Esquema del receptor de GnRH I (Adaptado de Neill, 2002).

La ocupación del receptor por la GnRH o una sustancia análoga, origina un cambio en su configuración que provoca un aumento de su afinidad por la proteína G, su activación y la disociación de la subunidad de dicha proteína. Esta subunidad puede moverse libremente por el plano interno de la membrana, donde interacciona con la fosfolipasa C, activándola.

La fosfolipasa C es una enzima ligada a la membrana celular cuya actividad consiste en incrementar la tasa de degradación de fosfatidilinositol (4,5) bifosfato en diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5) trifosfato (IP₃). El DAG y el IP₃ actúan como segundos mensajeros de la señal de la GnRH:

- el IP₃ se fija a la membrana del retículo endoplásmico y provoca la apertura de los canales de calcio consiguiendo un incremento de la concentración del ión calcio intracitosólico. Como consecuencia se producen diferentes efectos (dependiendo del tipo de célula estimulada): contracción de músculo liso, aumento de secreción de glándulas exocrinas y aumento de liberación de hormonas y neurotransmisores.
- El DAG permanece asociado a la membrana, provocando el desplazamiento de la proteína-quinasa C del citosol a la membrana y regulando su actividad, que deriva en diversos efectos: liberación de hormonas y neurotransmisores, contracción del músculo liso, promoción tumoral y transporte de iones.

Esta actividad se traduce en la liberación de gránulos de FSH y LH en la hipófisis. Por otro lado, desde que se descubrió la existencia de receptores para GnRH extrahipofisarios, se están desarrollando estudios para determinar los posibles efectos directos sobre el ovario, el oocito y el embrión (Huirne y Lambalk, 2001).

La cuantificación de la actividad de la GnRH ha de realizarse de forma indirecta mediante la determinación de la secreción pulsátil de LH ya que la corta vida media de esta hormona (2 - 5 min) y la difícil accesibilidad a la circulación portal hipotálamo-hipófisis complican la determinación directa de sus niveles (Conn y Crowley, 1994; Coccia *et al.* 2004).

Esta corta vida media de la GnRH, unida a la utilidad de poder controlar la liberación de gonadotropinas y principalmente a la restricción de administrar preparados de origen nervioso, fue lo que justificó en su momento el intento de desarrollar análogos de GnRH para su uso en protocolos de experimentación y técnicas de reproducción.

El descubrimiento por parte de Schally y Guillermin de la secuencia de aminoácidos de este decapeptido, permitió el desarrollo de compuestos con acción agonista o antagonista de GnRH. En un principio se pensó que la obtención de estos compuestos sintéticos no representaría un gran problema ya que bastaría con la sustitución de uno o dos aminoácidos de la cadena proteica, pero fueron más de 30 años de experimentación los que llevaron a la síntesis de compuestos con un perfil farmacocinético, de seguridad y comercial aceptables. Los dife-



rentes intentos realizados hasta llegar a los análogos hoy disponibles perseguían fundamentalmente la síntesis de compuestos con mayor actividad, sin efectos secundarios y capaces de permanecer más tiempo en el organismo. En el caso de los antagonistas se sucedieron tres generaciones de compuestos hasta llegar a los actualmente comercializados como cetrorelix, iturelix, azaline B, ganirelix, abarelix y antarelix (Huirne y Lambalk, 2001), ya que los primeros compuestos sintetizados (primera y segunda generación de antagonistas), presentaban el inconveniente de producir reacciones anafilácticas importantes debidas a la liberación de histamina (Coccia *et al.* 2004).

La actividad inhibidora de los análogos-agonistas de GnRH se basa en su capacidad para producir una desensibilización de los receptores localizados en las células de la hipófisis. La unión del agonista al receptor produce un estímulo que se traduce en un aumento inicial de la liberación de LH (*flare-up*); seguidamente se produce una disminución en la expresión del número de receptores responsable del descenso inicial de la respuesta por parte de la hipófisis y finalmente, por mecanismos todavía no totalmente conocidos, se produce una desensibilización de los receptores que, a su vez, provoca una disminución mantenida de la secreción de hormona luteinizante (Coccia *et al.* 2004).

Los agonistas de GnRH han demostrado, a lo largo de la experiencia clínica, tener un perfil de efectos secundarios considerablemente aceptable y una eficacia probada. Las dosis utilizadas en protocolos de asistencia a la reproducción en la especie humana son menores que las requeridas en el caso de los antagonistas, pero el inicio de su acción requiere al menos 7-14 h. Además, su mecanismo de acción todavía presenta lagunas, lo que ha ido desplazando su uso a favor de los antagonistas de GnRH (Conn y Crowley, 1994).

El principal mecanismo de acción de los antagonistas de GnRH (GnRHa) es el bloqueo competitivo de los receptores de GnRH. A diferencia de lo que sucede con los agonistas, los GnRHa no producen estimulación inicial de la liberación de gonadotropinas sino una supresión inmediata y reversible de la producción de FSH y LH, de duración e intensidad dosis dependiente y completamente reversible en 24-72 h al conservar la adenohipófisis su capacidad de respuesta frente al estímulo de la GnRH. Entre las 4 y 24 h posteriores a la administración del antagonista (6 h como media), se observa una disminución en la concentración de FSH en plasma del 30% y del 70%, en el caso de la LH.

No obstante, tras la administración de una dosis submaximal de GnRH_a todavía pueden detectarse gonadotropinas en plasma, lo que podría indicar la existencia de un bloqueo incompleto o, lo que es más probable, la existencia de procesos de secreción de gonadotropinas no dependientes de GnRH (Huirne y Lambalk, 2001).

Los GnRH_a presentan, tanto en el caso de una administración única como en el caso de múltiples dosis, una cinética lineal en función de la dosis y procesos de eliminación de primer orden principalmente por metabolismo vía hepática (Coccia *et al.*, 2004). Su eficacia no varía si la administración de dosis iguales tiene lugar por vía subcutánea o intramuscular, pero la administración intranasal (de uso exclusivo en humana) requiere generalmente dosis superiores. La absorción de estos compuestos tras la administración subcutánea es prácticamente completa (biodisponibilidad $\geq 85\%$) y rápida, presentando el pico de concentración plasmática máxima aproximadamente una hora después de su administración. La unión a proteínas plasmáticas varía ligeramente según el compuesto ($> 80\%$) y la semivida plasmática de la administración única de la dosis clínica por vía subcutánea de los preparados de liberación no retardada varía, entre 5 y 30 h dependiendo del fármaco; estos valores aumentan a 20 – 80 h si el protocolo incluye la administración de dosis múltiples (Coccia, 2004).

Los antagonistas actualmente disponibles se comercializan, como en el caso de los agonistas, para administración parenteral; actualmente se está investigando una nueva generación de antagonistas de origen no peptídico cuya administración podría ser oral, con las ventajas que esta vía de administración representa en humana (Millar *et al.* 2000).

En general, los compuestos de más reciente aparición son seguros, no habiendo evidencia alguna de una posible atrofia de los órganos diana. Los efectos secundarios derivados de la utilización de antagonistas de la GnRH son los mismos que se observan con los agonistas y son los atribuibles a un hipoestrogenismo en hembras y a un hipoandrogenismo en machos (una exposición prolongada a estos fármacos puede conducir a una pérdida de la densidad mineral ósea del 2-8 %). A nivel local puede observarse cierta reacción en el punto de administración que, generalmente, revierte en poco tiempo. Hasta el momento no se han observado efectos sobre el número de alteraciones fetales o de abortos (Hanssens, 2000).

La administración de análogos (tanto agonistas como antagonistas)



de GnRH está indicada en los casos que requieran inhibición de la liberación de gonadotropinas hipofisarias, como es el caso de tumores hormono-dependientes. También se ha utilizado la administración pulsátil de análogos de GnRH en el restablecimiento de la fertilidad en machos y en hembras con deficiencias en la producción, para conseguir la normalización del eje hipófisis-gonadal (Conn y Crowley, 1994).

La aplicación clínica de los antagonistas de GnRH incluye las situaciones en las que se requiere una “castración bioquímica” por bloqueo indirecto de la secreción de hormonas sexuales al inhibir la producción de gonadotropinas a nivel hipofisario. Los antagonistas de GnRH podrían estar así indicados en el caso que exista una alteración hormono-dependiente como sucede en las hembras en los casos de síndrome de hiperestimulación ovárica, síndrome de ovario poliquístico -en el que los niveles elevados de LH parecen ser responsables de los altos niveles de andrógenos que afectan negativamente al desarrollo folicular-, endometriosis y cáncer ginecológico -puesto que al parecer los altos niveles de LH y FSH podrían estimular el crecimiento del tumor- o en los machos en casos de leiomioma, cáncer de próstata o hipertrofia benigna de próstata (Huirne y Lambalk, 2001).

Adicionalmente, la combinación de antagonistas de GnRH con andrógenos podría jugar un papel clave en la contracepción masculina al suprimir la espermatogénesis y producir azoospermia (Coccia *et al.* 2004).

En técnicas de reproducción asistida en las que la inducción de la ovulación es seguida de FIV o transferencia intrafalopiana de gametos los GnRH también se pueden utilizar, bien para evitar la aparición de picos endógenos prematuros de LH o en la regulación hormonal del estatus ovárico, como tratamiento previo al de superovulación (Ortmann *et al.* 2001).

Incorporación de los fármacos antagonistas de GnRH a los protocolos de superovulación

En la actualidad, la mayoría de los protocolos de reproducción asistida, superovulación y recogida de embriones en ovejas, incluyen la administración de progestágenos por vía intravaginal para la sincronización del celo y de la ovulación de todos los animales en el mismo grupo de tratamiento, y la administración de varias dosis de FSH ovina

para la estimulación ovárica.

Si bien los resultados han mejorado notablemente en los últimos años, existen aún limitaciones que se han relacionado con el estatus folicular, el número y la distribución por tamaño de los folículos en el momento de iniciar el tratamiento con FSH. La población folicular idónea para responder al tratamiento de superovulación (máximo número posible de pequeños folículos sensibles a las gonadotropinas sin presencia de folículos dominantes) podría ser inducida mediante la administración de fármacos antagonistas de GnRH.

La mayor parte de los trabajos realizados con antagonistas de GnRH en tratamientos de reproducción asistida se han realizado en protocolos de fertilización *in vitro* (FIV) en la especie humana, con el fin de evitar la aparición de una descarga prematura de LH (Felberbaum, 1995). Actualmente, la mayoría de estos protocolos incluyen un tratamiento de estimulación ovárica controlada con el fin de incrementar el número de oocitos fertilizables. En un primer momento, la hiperestimulación ovárica se llevó a cabo mediante la administración de gonadotropinas exógenas, bien solas o en combinación con citrato de clomifeno (Kistner, 1976). Sin embargo, y a pesar del seguimiento que se hacía del crecimiento folicular, el 10-25 % de los ciclos no culminaban en ovulación, debido a la aparición de picos prematuros de LH (Gordon, 2001). Cuando, a mediados de los años 80, se estudió en profundidad el papel de la GnRH en la liberación de LH a nivel de la hipófisis y se sintetizaron los primeros análogos de esta hormona, éstos empezaron a utilizarse para impedir la aparición de estos picos de LH favoreciendo la maduración de los folículos hasta el momento previsto para la recogida de los oocitos. De esta forma, y aunque la finalidad de los antagonistas de GnRH no era ésta, este grupo farmacológico ha pasado a ser parte del tratamiento estándar utilizado en mujeres durante la estimulación ovárica previa a la aplicación de FIV, presentando numerosas ventajas frente a los agonistas en lo que a duración del tratamiento y número de administraciones se refiere (Gordon, 2001).

Los antagonistas de GnRH más utilizados han sido ganirelix y cetrorelix, que han demostrado en diversos estudios un perfil de eficacia y seguridad comparable al de los fármacos agonistas (Diedrich *et al.* 1994; The Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998; Albano *et al.* 2000; Olivennes *et al.* 2000). En lo que a efectos secundarios se refiere,



parece que una de las ventajas de la utilización de antagonistas podría ser la menor incidencia de aparición del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica, de frecuente presentación tras tratamientos de estimulación ovárica (de Jong *et al.* 1998).

La utilización de los antagonistas por los diversos grupos de trabajo presenta diferencias en cuanto al producto utilizado, la forma farmacéutica, la dosis y el protocolo de administración. En cuanto a los protocolos de administración de GnRH α pueden diferenciarse dos tendencias según se administren dosis múltiples o dosis únicas.

En los protocolos de dosis múltiples, el antagonista se administra en pequeñas dosis desde la mitad de la fase folicular hasta la administración de la gonadotropina coriónica humana (Diedrich *et al.* 1994; Albano *et al.* 1997). En el trabajo de Albano *et al.* se demostró, previa comparación de la administración diaria en protocolos de dosis múltiple 0,1; 0,25 y 0,5 mg de cetorelix, que la dosis mínima eficaz era la de 0,25 mg de antagonista. Olivennes *et al.* (2000) demostraron, siguiendo el protocolo de los estudios realizados con Nal-Glu por Frydman *et al.* (1992), que la administración de una segunda dosis (5 mg) del antagonista a las 48 h de haber administrado otra dosis idéntica era, en la mayor parte de los casos, innecesaria.

Partiendo de los resultados obtenidos en el estudio anterior, los mismos autores diseñaron un nuevo protocolo de administración basado en la administración de una dosis única cetorelix (3 mg) al final de la fase folicular; con él se conseguía una gran eficacia en la prevención de los picos prematuros de LH y se mejoraban los resultados en cuanto al cumplimiento del tratamiento.

Dentro de los protocolos de dosis únicas, se ha intentado encontrar la dosis mínima eficaz mediante estudios comparativos de eficacia tras administraciones de cetorelix a dosis de 2 y 3 mg. Aunque no se observaron diferencias entre ambas dosis en los resultados de la fecundación *in vitro*, sí se observó una mayor duración del efecto inhibitorio sobre la liberación de LH con la dosis mayor (Olivennes *et al.* 1998). En los estudios con ganirelix (The Ganirelix Dose-Finding Study Group, 1998), administrado a mujeres a dosis diarias de 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/día, se observó que la dosis menor era capaz de evitar la aparición de picos prematuros de LH y ofrecía mejores resultados clínicos ya que, con dosis superiores, los resultados en cuanto a tasa de implantación eran peores; este hallaz-

go podría relacionarse con posibles efectos secundarios derivados de la actividad directa de los antagonistas sobre el endometrio (Hernández, 2000).

Basándose en estos resultados, se podría pensar en la utilidad de preparaciones de liberación controlada, similares a las utilizadas en los tratamientos de procesos tumorales hormono-dependientes, que prolongaran en el tiempo los efectos de los GnRH α sobre la liberación de LH sin provocar efectos secundarios. Boutignon *et al.* (1999) reformularon el fármaco antagonista teverelix (Antarelix®), en forma de sal de acetato soluble, mediante un proceso patentado para producir microgránulos biodegradables libres de solventes y se lo administraron por vía subcutánea a perros Beagle (20 mg). Comprobaron que, tras una administración única, los niveles de testosterona disminuían por debajo de 0,5 ng/ml (nivel de castración) durante un periodo de 80 días.

En reproducción animal, las primeras experiencias realizadas con antagonistas de GnRH en ganado ovino para inhibir el crecimiento folicular y desencadenar la aparición controlada de una nueva onda de crecimiento (Brebion, 1990), se basaron en el uso de dosis diarias durante los 11 días que se mantiene el tratamiento de sincronización de ciclos, previo al inicio del tratamiento de superovulación con FSH. Estos trabajos mostraron mejores resultados en cuanto al número de embriones viables pero su aplicación práctica se vió condicionada por factores limitantes económicos, de manejo y de variabilidad en la respuesta.

Posteriormente, un segundo objetivo, en ganado vacuno, fue su uso para eliminar la secreción endógena pulsátil de LH y retrasar el pico preovulatorio de LH, consiguiendo así prolongar la fase folicular y mejorar la calidad tanto de los folículos como de los oocitos (Oussaid *et al.* 2000). Sin embargo, la administración de teverelix (1,6 mg cada 12 h durante 36 h) en terneras durante tratamientos de superovulación (pFSH, 24 mg, durante 4 días) inducía la aparición de una mayor tasa de atresia (36-58 % de los folículos mostraban signos de atresia temprana o avanzada) y una disminución en las concentraciones de estradiol y progesterona. Estos efectos no influían en el desarrollo potencial de los oocitos recuperados de los folículos atrésicos y cultivados *in vitro* durante ocho días. Si el tratamiento con teverelix se prolongaba a 60 h, el número de folículos con signos de atresia terminal evidente alcanzaba el 90 % del total de folículos recogidos.



En pequeños rumiantes, los protocolos de superovulación que incorporan la administración de GnRHa de tercera generación son recientes (Cognie, 1999) y han aportado resultados preliminares prometedores. En cabras, la administración de *teverelix* (0,5 mg/día, durante 11 días a partir del 2º día postadministración del progestágeno intravaginal) puso de manifiesto el potencial papel de estos fármacos en las nuevas técnicas de reproducción; la inhibición de la actividad hipofisaria se reflejó en una clara disminución de las concentraciones plasmáticas de FSH y LH y, como consecuencia de ello, se multiplicó por dos el número de folículos de pequeño tamaño impidiéndose el crecimiento de folículos dominantes (González-Bulnes *et al.* 2004c). Sin embargo, en ganado caprino, el número de embriones viables obtenidos cuando se administra un tratamiento de superovulación con posterioridad al uso de un antagonista de GnRH es bajo (Cognie *et al.* 2003). Esto podría deberse a la fuerte disminución en el crecimiento de folículos hasta los estadios intermedios -folículo dependiente de gonadotropinas- causada por el aporte de GnRHa (González-Bulnes *et al.* 2004c), a pesar de que la función hipofisaria se recupera al suspender la administración del antagonista (González-Bulnes *et al.* 2004b).

Para disminuir los inconvenientes derivados del manejo de los animales, Alabart *et al.* (2001) han realizado diversas experiencias en ovejas sobre tratamientos clásicos de superovulación (progestágeno intravaginal, 14 días; pFSH i.m., dos veces al día durante 4 días y pLH i.v. junto con las dos últimas dosis de pFSH) en los que han incorporado la administración de antagonistas de GnRH en regímenes de dosis múltiples y dobles y han valorado su eficacia en la tasa y calidad de los embriones recuperados, después de monta natural ó IA a los 8 días de la retirada del tratamiento con progestágenos. La administración subcutánea de 11 dosis de *teverelix* (0,5 mg, cada 24 h, comenzando el día de la administración del progestágeno) ofrecía un bloqueo prácticamente completo de la secreción de LH hipofisaria. Sin embargo, con el tratamiento de dosis doble (0,5 mg de *teverelix*, separados 6 días, comenzando el mismo día de la administración intravaginal de progestágenos), se mantenían concentraciones plasmáticas significativas de LH, por lo que se cree que este régimen no sería válido y se necesitarían nuevos estudios para poder establecer un régimen de dosificación óptimo y sencillo.

En ese mismo período, en la Universidad de Edimburgo, se ha probado la alternativa de administración subcutánea de una única dosis

elevada (22 mg) de GnRHa. Los resultados mostraron que esta dosis producía la deprivación hipofisaria completa por un período aproximado de dos meses (Souza *et al.* 2000), lo que daba lugar a la desaparición total de los folículos dominantes y a un fuerte incremento de la población de folículos gonadotropo-dependientes (González-Bulnes *et al.*, 2003c). Sin embargo, los protocolos de superovulación utilizados en ganado ovino no necesitarían periodos tan prolongados de inhibición de la función hipofisaria, por lo que sería preciso el estudio de la relación entre el efecto y las concentraciones del fármaco en plasma a dosis más bajas para poder establecer pautas posológicas adecuadas a nuestros objetivos.

Durante la realización del trabajo experimental objeto de esta Memoria, se ha publicado un estudio preliminar comparando la eficacia de utilización del antagonista de GnRH teverelix según el protocolo de dosis bajas múltiples (11 x 0,5 mg) con un protocolo en el que, con intervalos de 5 días, se administraron 3 dosis de 1,5; 0,5 y 0,5 mg de teverelix (Cognie *et al.* 2003). Con la administración de 3 dosis de teverelix se obtuvo una elevada respuesta ovulatoria pero un menor número de embriones transferibles que el obtenido con el régimen de dosis múltiples; según hipótesis de los autores, estos resultados podrían estar relacionados con la aparición prematura de picos de LH debida al efecto insuficiente de la tercera dosis sobre la actividad hipofisaria.



Desarrollo experimental



Desarrollo Experimental

En el desarrollo de este trabajo se contemplaron dos experimentos encaminados a determinar la respuesta hipofisaria y ovárica después de la administración, por vía subcutánea, de distintas dosis del antagonista de GnRH teverelix y valorar su inclusión en protocolos de superovulación y transferencia de embriones en ganado ovino. El objetivo final buscaba sentar las bases para el establecimiento de nuevos tratamientos de estimulación ovárica que permitan mejorar los resultados de las técnicas de producción de embriones, tanto *in vivo* como *in vitro*, minimizando el manejo de los animales.

Los experimentos fueron realizados utilizando 39 ovejas de raza Manchega ubicadas, en régimen de estabulación, en la granja experimental del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) de Madrid, situada en una latitud aproximada de 40 °N. Todas las hembras eran adultas (2-6 años de edad), en periodo de secado y con una adecuada condición corporal durante la fase experimental, careciendo de antecedentes patológicos. La alimentación consistía en una ración de concentrado, alfalfa deshidratada y paja de cereales con un suplemento de vitaminas y minerales. Los locales, con una superficie de 125 m², disponían de zonas cubiertas y parques donde los animales recibían los cambios habituales de luz y temperatura de cada estación del año. Las experiencias tuvieron lugar durante la época de actividad reproductiva (enero-marzo y junio-diciembre), puesto que es en esta época cuando el efecto inhibitorio de los folículos dominantes es más acusado (González-Bulnes *et al.*, 2003b).

En el primer experimento se estudió el efecto de la administración subcutánea de dos dosis diferentes (1,5 y 3,0 mg) del antagonista de GnRH teverelix (Antarelix®, Zentaris AG, Frankfurt, Alemania) sobre la secreción de gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) y sobre el desarrollo y la funcionalidad de la población folicular ovárica.

En una segunda fase se realizó la valoración del pretratamiento con una dosis subcutánea de 1,5 mg de teverelix en hembras sometidas posteriormente a protocolos de estimulación ovárica. Para ello se desarrolló un experimento con dos replicados. En el primero se valoró el efecto del antagonista sobre el desarrollo y la funcionalidad de la

población folicular en respuesta a la administración de FSH exógena, la aparición del comportamiento de celo y el pico preovulatorio de LH y la respuesta ovárica, tanto en lo que se refiere a tasa de ovulación como en lo que respecta al número y viabilidad de embriones. En el segundo replicado se valoró de nuevo la aparición de celo y pico de LH y la respuesta superovulatoria al tratamiento con FSH.



Experimento I: Valoración de los efectos de la administración de dosis únicas (1,5 mg y 3,0 mg) del antagonista de GnRH Teverelix por vía subcutánea sobre la actividad hipofisaria y la funcionalidad folicular.

Objetivo

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la administración subcutánea de dos dosis únicas (1,5 y 3,0 mg) del antagonista de GnRH teverelix sobre la función hipofisaria (patrones de secreción de FSH y LH) y los perfiles de crecimiento y funcionalidad folicular (patrón de secreción de inhibina A).

Metodología

Protocolo experimental

Para la realización de esta experiencia se utilizó un grupo de 18 ovejas. A 6 ovejas se les administró, por vía subcutánea, una dosis única de 1,5 mg (Grupo 1,5) y a otras 6 hembras, una dosis de 3,0 mg (Grupo 3,0) de Antarelix® (Teverelix, Zentaris AG, Frankfurt, Alemania), en 2 ml de solución salina. El resto de los animales (n=6) se utilizaron como Grupo Control, administrándose a cada individuo únicamente 2 ml de solución salina por la misma vía (Figura 2.1).

Dos días antes de iniciar el tratamiento con teverelix, cada individuo fue tratado con un progestágeno en forma de esponja de poliuretano, por vía intravaginal (45 mg de acetato de fluorogestona, FGA, Chronogest®, Intervet International, Boxmeer, Holanda), para posibilitar que los datos del estudio fueran obtenidos en las mismas condiciones en las que posteriormente se utilizará el fármaco en los protocolos de superovulación. De esta forma, se reproducirían posibles situaciones derivadas de las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas entre el GnRHa y el progestágeno durante el periodo de observación.

El comportamiento farmacodinámico de teverelix se estudió en base a las respuestas hipofisaria y ovárica a la administración del fármaco.

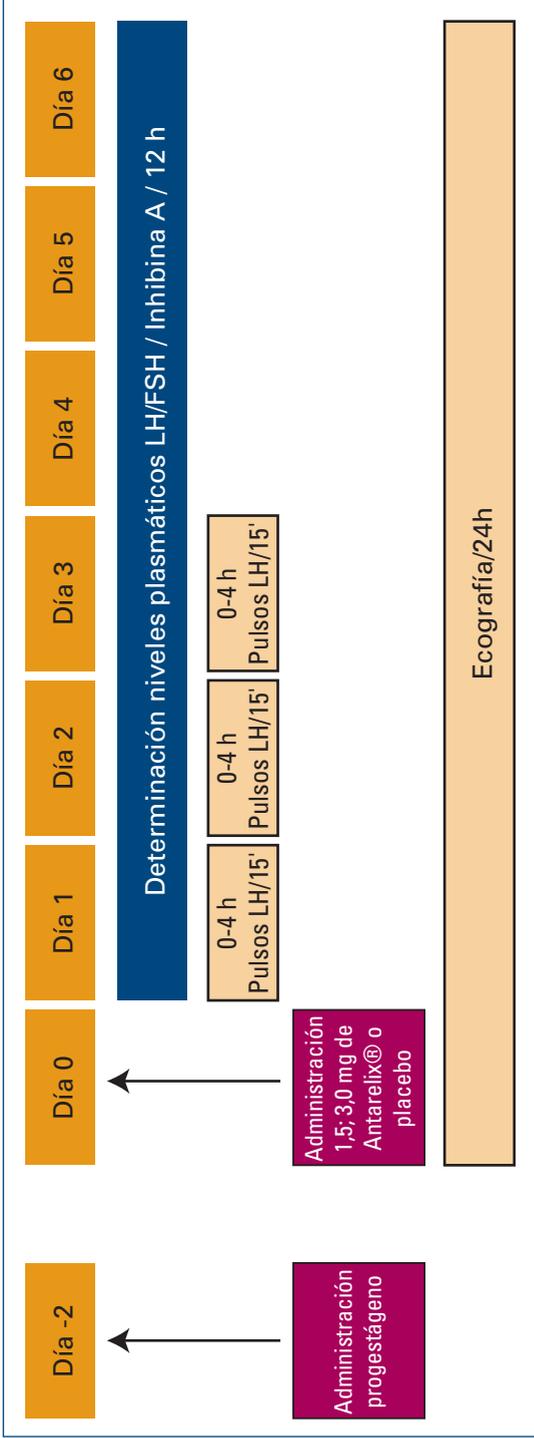


Figura 2.1. Esquema del Protocolo Experimental (Experimento 1)



La respuesta endocrina (concentraciones plasmáticas medias de las gonadotropinas FSH y LH) se determinó, en primer lugar, sobre muestras de 10 ml de sangre extraída de la vena yugular mediante la utilización de tubos heparinizados al vacío (Vacutainer® Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francia), obtenidas cada 12 h durante los 6 días posteriores a la administración del fármaco. Asimismo, se tomaron muestras seriadas, cada 15 minutos durante 4 h, a las 0, 24 y 48 h post-tratamiento, para valorar la funcionalidad hipofisaria mediante la determinación de posibles cambios en el perfil de secreción pulsátil de LH.

La determinación del efecto del fármaco sobre la dinámica de crecimiento y la actividad de la población folicular se llevó a cabo mediante un estudio morfométrico de los ovarios por ecografías transrectales seriadas, cada 24 h desde el momento de la administración de teverelix (Día 0) hasta el final de la experiencia (Día 6), y mediante un estudio funcional por valoración de los niveles plasmáticos de inhibina A en muestras sanguíneas obtenidas cada 12 h durante este mismo periodo.

Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 g durante 15 min, almacenando el plasma en tubos de poliestireno cerrados herméticamente que permanecían en un congelador a -20°C hasta el momento del análisis.

Determinación de las concentraciones hormonales en plasma

Los niveles de gonadotropinas (FSH y LH) fueron medidos por duplicado en alícuotas de 200 μ l de plasma según las técnicas de análisis radioinmunológico con doble anticuerpo descritas por Campbell *et al.*, (1990) y por McNeilly *et al.*, (1987), respectivamente. El límite de detección fue de 0,1 ng/ml para FSH y 0,2 ng/ml para LH. Los coeficientes de variación inter e intraanálisis fueron menores al 10% para ambas hormonas.

Los niveles de inhibina A fueron medidos por duplicado en alícuotas de 200 μ l de plasma mediante la técnica de análisis enzimoimmunológico descrita por Knight *et al.* (1998) y modificada por McNeilly *et al.* (2000). La sensibilidad del análisis fue de 7 pg/ml y los coeficientes de variación inter e intraanálisis de 7,6 % y de 11,9 %, respectivamente.

Estudio morfométrico de los ovarios

Se realizó mediante ultrasonografía, con un ecógrafo Aloka 500 SSD (Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japón) equipado con una sonda transrectal de haz lineal y una frecuencia de 7,5 MHz. El examen de los ovarios se llevó a cabo según la técnica descrita por Schrick *et al.* (1993) y validada en nuestro laboratorio mediante comparación con observaciones histológicas (González-Bulnes *et al.*, 1994). Una vez localizado el ovario (Figura 2.2) se determinaba el diámetro de todos los folículos mayores o iguales a 2 mm, y su posición topográfica. A partir de la observación realizada, se hacía un esquema del ovario en el que se señalaba el tamaño y la localización de los folículos identificados en relación a la posición del cuerpo lúteo, hilio y estroma.

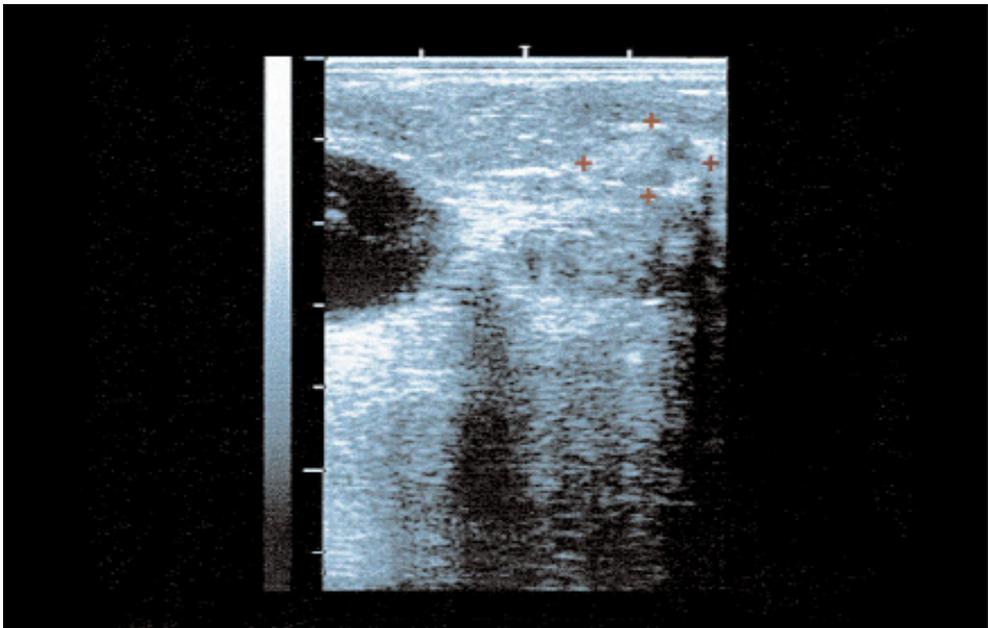


Figura 2.2. Imagen de un ovario de oveja visualizado mediante ecografía transrectal (Los diámetros del ovario aparecen señalados entre cruces).



Análisis de Datos

Concentraciones plasmáticas de hormonas

La valoración de los niveles de hormonas en sangre periférica se realizó de forma individualizada con el fin de evaluar la funcionalidad hipofisaria (FSH y LH) y folicular (inhibina A) en cada animal. Los efectos del tratamiento y el día de observación sobre las concentraciones hormonales fueron valorados por análisis de varianza (split-plot ANOVA). Los datos se expresaron como media \pm error estándar y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

La relación entre el día de observación y los cambios en las concentraciones hormonales fueron analizados mediante análisis de correlación y regresión lineal. Estas relaciones fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Población folicular

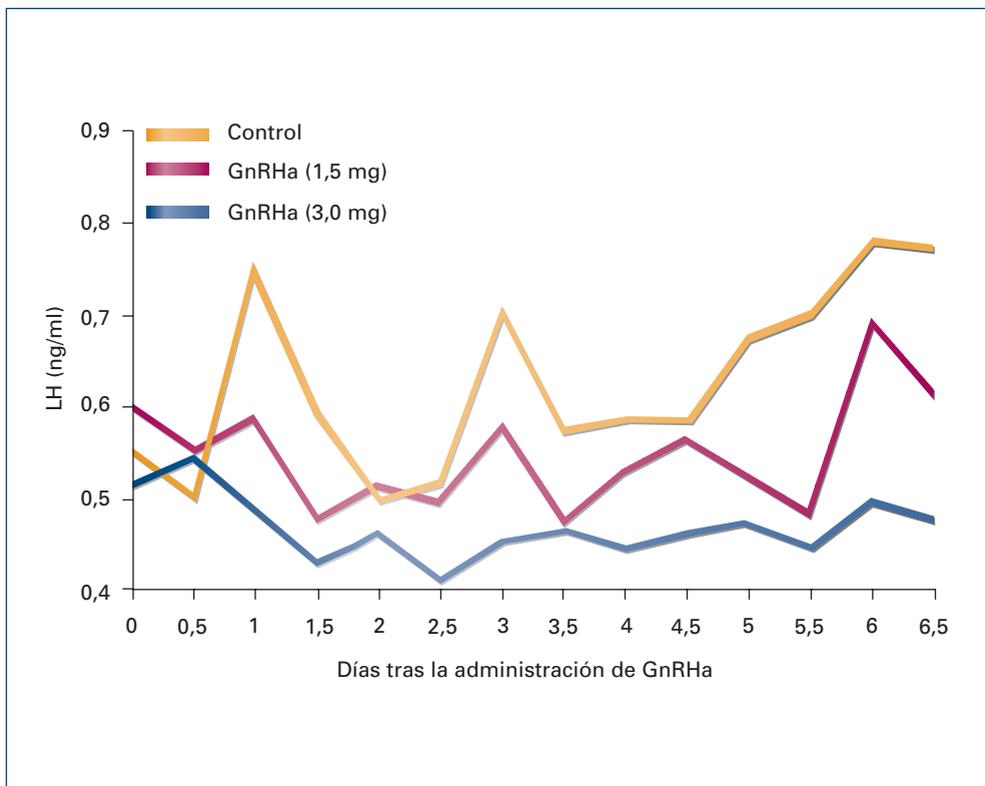
Los datos obtenidos en las observaciones ecográficas de los folículos presentes en los ovarios fueron sometidos a dos análisis diferentes para valorar posibles cambios en la población folicular. En el primer análisis se valoró el número total de folículos ≥ 2 mm en desarrollo en cada observación; para el segundo, se clasificó el número total de folículos ≥ 2 mm en tres categorías: folículos grandes (≥ 6 mm), medianos (4-5 mm) y pequeños (2-3 mm) y se cuantificó el número de folículos de cada una de ellas.

Los efectos del tratamiento y el día de observación sobre el número y tamaño de los folículos fueron estimados por análisis de varianza (split-plot ANOVA). Los datos se expresaron como media \pm error estándar y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$. La relación entre el día de observación y los cambios en la población folicular fueron analizados mediante análisis de correlación y regresión lineal, considerando estadísticamente significativas aquellas relaciones con una $p < 0,05$.

Perfiles de secreción de gonadotropinas hipofisarias

La administración de ambas dosis del antagonista de GnRH *teverelix* (1,5 mg y 3,0 mg) produjo una disminución de las concentraciones plasmáticas de FSH y LH.

En el momento de la administración del antagonista, la concentración plasmática media de LH era similar para todos los grupos ($0,55 \pm 0,21$ para los animales del grupo control, $0,59 \pm 0,20$ en el caso del grupo tratado con 1,5 mg y $0,51 \pm 0,20$ ng/ml en las hembras tratadas con dosis de 3,0 mg; Gráfica 2.1).



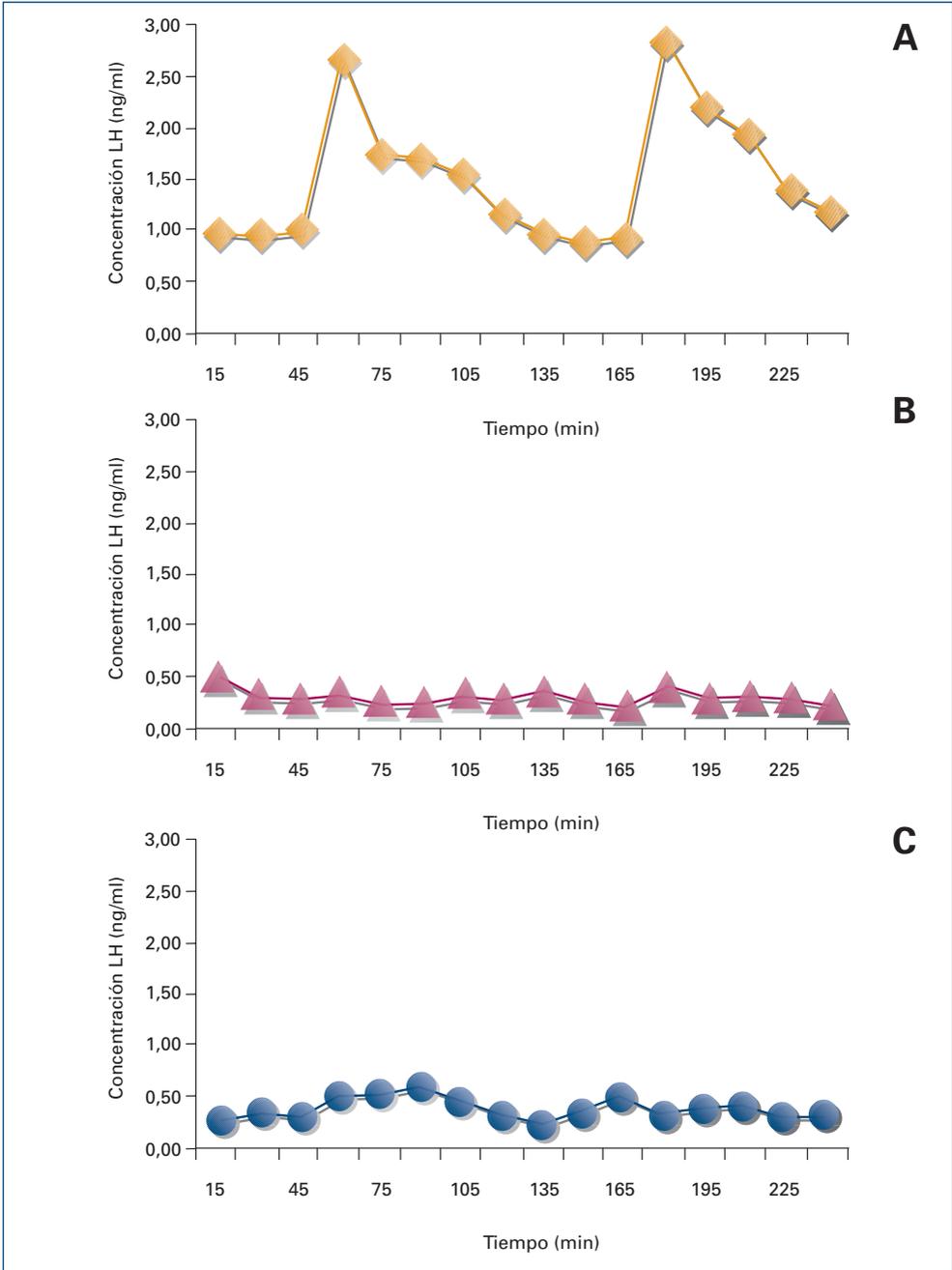
Gráfica 2.1.- Concentraciones medias de LH (ng/ml) en relación al tiempo transcurrido desde la administración del GnRH a para los grupos control y tratados con 1,5 mg y 3,0 mg de *teverelix* (Tabla A.1).



En los animales del grupo control, el valor medio de LH durante el periodo de estudio fluctuó entre 0,5 y 0,8 ng/ml, observándose los niveles más altos durante los días 1, 3 y 6. En los animales tratados con una dosis de 1,5 mg de teverelix, se observó un patrón de LH similar al que presentaba el grupo control pero con una concentración media de LH menor ($0,55 \pm 0,13$ vs $0,63 \pm 0,22$ ng/ml en el grupo control; $p < 0,0005$). En el caso de la administración de la dosis superior (3,0 mg) se observó un cambio en los perfiles de secreción de LH, sin las fluctuaciones

	CONTROL					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	media	eem	media	eem	media	eem
CC media LH (ng/ml)	0,52	$\pm 0,02$	0,82	$\pm 0,08$	0,62	$\pm 0,04$
CC basal LH (ng/ml)	0,51	$\pm 0,02$	0,76	$\pm 0,06$	0,61	$\pm 0,03$
Frecuencia pulsos (pulso/8h)	0,17		0,50		0,17	
Amplitud pulsos (ng/ml)	0,71		1,54		0,95	
	1,5 mg GnRH α					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	media	eem	media	eem	media	eem
CC media LH (ng/ml)	0,42	$\pm 0,04$	0,38	$\pm 0,02$	0,34	$\pm 0,02$
CC basal LH (ng/ml)						
Frecuencia pulsos (pulso/8h)	-					
Amplitud pulsos (ng/ml)						
	3,0 mh GnRH α					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	media	eem	media	eem	media	eem
CC media LH (ng/ml)	0,45	$\pm 0,03$	0,46	$\pm 0,03$	0,42	$\pm 0,03$
CC basal LH (ng/ml)						
Frecuencia pulsos (pulso/8h)	-					
Amplitud pulsos (ng/ml)						

Tabla 2.1.- Valores de las concentraciones medias y basales y de los parámetros de pulsatilidad de LH para los grupos control y tratados con teverelix (1,5 y 3,0 mg)



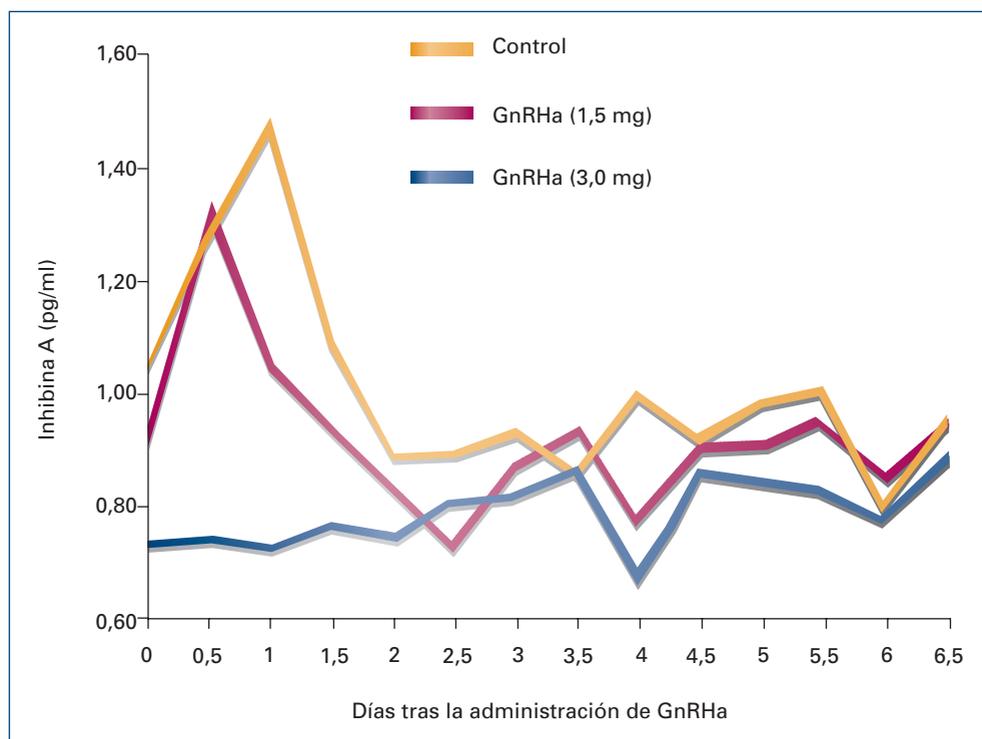
Gráfica 2.2.- Evolución de las concentraciones individuales de LH (ng/ml) en relación al tiempo transcurrido desde la administración del GnRHa en tres animales representativos de los grupos control (A) y tratados con 1,5 mg (B) y 3,0 mg (C) de teverelix.



observadas anteriormente; asimismo, el valor medio disminuyó en comparación con el grupo control ($0,47 \pm 0,07$ ng/ml; $p < 0,00001$), siendo la disminución para esta dosis (3 mg) de antagonista superior a la observada con la dosis de 1,5 mg ($p < 0,00005$).

Las concentraciones basales de LH durante los periodos de 4 h en los que se tomaron muestras para detectar su pulsatilidad, oscilaron entre 0,51 y 0,76 ng/ml para los animales del grupo control; en los animales tratados, tanto con 1,5 como con 3,0 mg, se observaron valores entre 0,34-0,42 ng/ml y entre 0,42-0,46 ng/ml, respectivamente (Tabla 2.1).

En los animales del grupo control se detectaron pulsos de LH en los tres periodos analizados con una frecuencia que variaba de 0,17 a 0,50 pulsos/4 h y una amplitud de 0,71-1,54 ng/ml. Sin embargo, no se detectó ningún pulso de LH en los animales tratados con teverelix durante los diferentes periodos de observación (Gráfica 2.2).



Gráfica 2.3.- Concentraciones medias de FSH (ng/ml) en relación al tiempo transcurrido desde la administración del GnRHα para los grupos control y tratados con 1,5 mg y 3,0 mg de teverelix (Tabla A.2).

A diferencia de lo que ocurría en el caso de la LH, el análisis de la concentración media de FSH en plasma en el momento de la administración del antagonista puso de manifiesto diferencias entre los distintos grupos; los niveles hormonales fueron inferiores en el grupo que posteriormente sería tratado con 1,5 mg ($0,73 \pm 0,23$ ng/ml) que en los animales utilizados como grupo control ($1,04 \pm 0,26$ ng/ml; $p < 0,05$) o en aquellos a los que se les administraría la dosis superior, de 3,0 mg ($0,91 \pm 0,24$ ng/ml; $p = 0,09$) (Gráfica 2.3).

En los animales control y en los tratados con 3 mg, las concentraciones de FSH experimentaron un incremento 12 h después del tratamiento para disminuir posteriormente, mientras los niveles se mantuvieron estables alrededor de 0,8 ng/ml en el grupo tratado con la dosis inferior. La concentración media de FSH durante el periodo de toma de muestras fue de $1,01 \pm 0,30$ ng/ml en los animales control, $0,79 \pm 0,18$ ng/ml en el grupo tratado con la dosis menor del antagonista ($p < 0,00005$ con respecto al control) y $0,92 \pm 0,22$ ng/ml en el tratado con mayor dosis ($p < 0,05$ con respecto al grupo control); entre ambos grupos de tratamiento se observaron también diferencias significativas ($p < 0,01$).



Dinámica de crecimiento y funcionalidad folicular

La administración de ambas dosis de antagonista se relacionó con una disminución en el número de los folículos de mayor tamaño y un aumento en el número de folículos de menor tamaño, durante un periodo aproximado de 3 días postadministración (Figura 2.3).

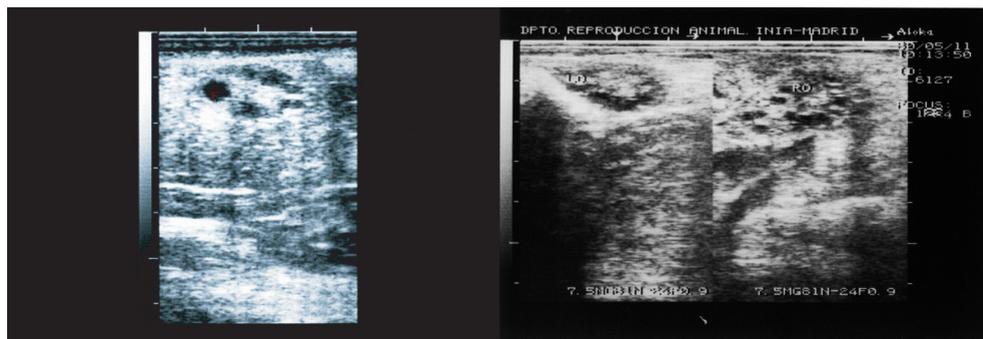
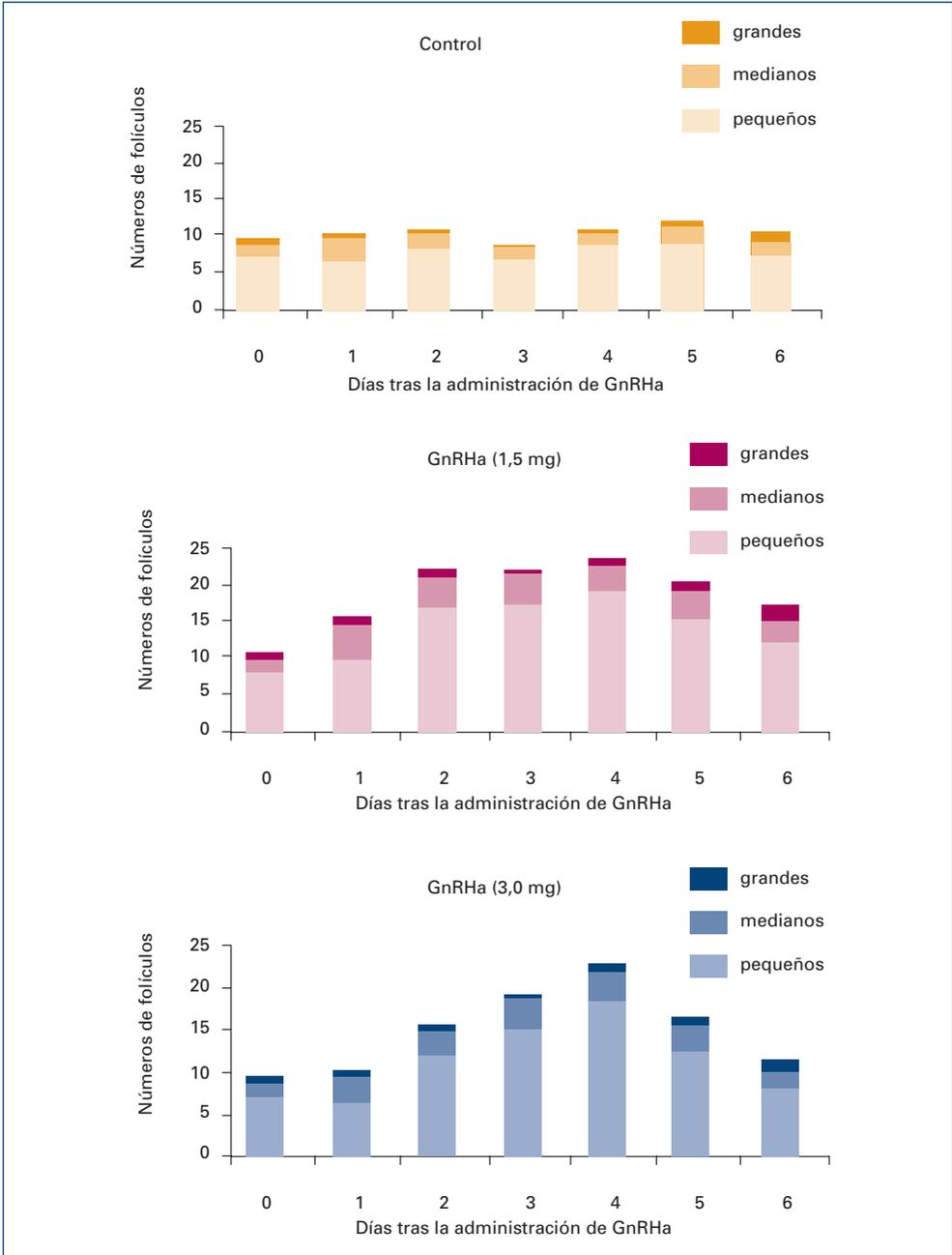


Figura 2.3. Imagen ultrasonográfica representativa de la población folicular de una hembra control (izquierda) y una hembra tratada con antagonista de GnRH (derecha).

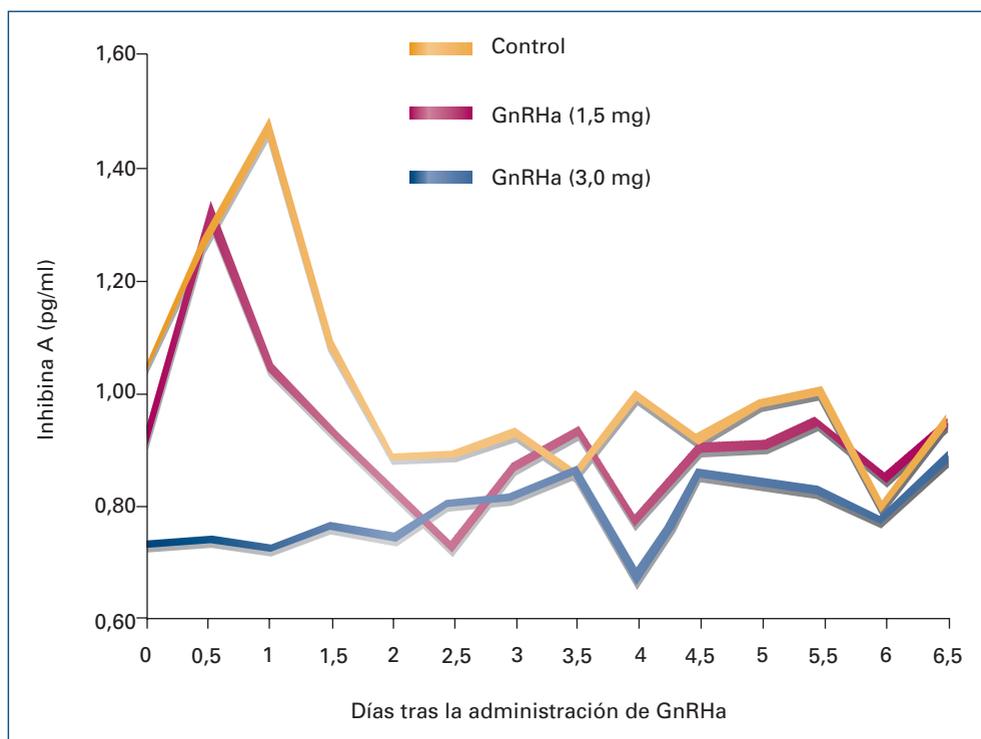
Así, en los animales tratados, el número de folículos de tamaño ≥ 6 mm resultó menor en los Días 2 y 3 ($0,3 \pm 0,2$ folículos para el grupo tratado con 1,5 mg de teverelix y $0,5 \pm 0,2$ folículos para los animales tratados con la dosis de 3 mg) en comparación con el grupo control ($1,2 \pm 0,3$; $p < 0,005$) (Gráfica 2.4). En el grupo de animales control, la presencia de un mayor número de folículos de gran tamaño se relacionaba inversamente con los niveles de FSH ($p < 0,05$). Esta correlación no pudo ser observada en los animales tratados.

Por otro lado, el número total de folículos pequeños (2-3 mm) aumentó en los dos grupos tratados desde el Día 0. En el caso de los animales tratados con 1,5 mg de antagonista, este valor aumentó de forma rápida alcanzando su cifra máxima en el Día 2 ($19,8 \pm 1,1$ vs $5,8 \pm 0,5$ folículos del grupo control; $p < 0,0005$) y permaneciendo en un número medio de $17,2 \pm 0,6$ folículos hasta el Día 5 en el que empezó a disminuir. En el grupo tratado con 3 mg el incremento en el número de folículos con un tamaño de 2-3 mm fue más lento, alcanzando el valor máximo en el Día 4 ($18,7 \pm 0,7$ vs $5,5 \pm 0,7$ folículos del grupo control; $p < 0,00001$) y disminuyendo drásticamente a $8,2 \pm 0,6$ en el Día 6.



Gráfica 2.4.- Número de folículos grandes (>6 mm), medianos (4-5 mm) y pequeños (2-3 mm) en función del tiempo transcurrido desde la administración del antagonista de GnRH, para el grupo control y los tratados con 1,5 mg y 3,0 mg de teverelix (Tabla A.3).

En los animales del grupo control, el valor medio de inhibina A durante el periodo de estudio osciló entre los $122,38 \pm 4,52$ pg/ml del Día 0 y los $189,27 \pm 4,59$ pg/ml del Día 2, momento a partir del cual la concentración de esta hormona se mantuvo entre 167,97 y 186,75 ng/ml (Gráfica 2.5.). El análisis de las concentraciones plasmáticas de inhibina A mostró que la administración de 1,5 mg de antagonista disminuyó significativamente los niveles de esta hormona (de $235,60 \pm 3,98$ a $156,37 \pm 3,18$ pg/ml en las primeras 60 h, $p < 0,005$) para aumentar posteriormente hasta alcanzar concentraciones similares a las del grupo control alrededor del Día 4 ($171,07 \pm 3,47$ pg/ml). Sin embargo, el patrón de secreción de inhibina en el grupo tratado con 3 mg de teverelix fue diferente, presentando un ligero incremento, paralelo al del grupo control, en las primeras 48 h. Después, la concentración de inhibina A disminuyó drásticamente alcanzando su nivel más bajo el Día 4,5 ($182,59 \pm 3,75$ a $130,02 \pm 3,12$ pg/ml); esta concentración fue significativamente menor que en el grupo control ($171,33 \pm 2,04$ pg/ml);



Gráfica 2.5.- Concentraciones medias de Inhibina A (pg/ml) en relación al tiempo transcurrido desde la administración del GnRHa para los grupos control y tratados con 1,5 mg y 3,0 mg de teverelix (Tabla A.4).

$p < 0,01$) y que en los animales tratados con 1,5 mg ($172,57 \pm 3,32$ pg/ml, $p < 0,05$).

En el grupo control se observó que el número de folículos ≥ 4 mm estaba directamente relacionado con los niveles de inhibina A ($p < 0,005$). Esta correlación no pudo ser observada en los animales tratados.



Experimento II: Valoración del efecto de la administración subcutánea de una dosis única de 1,5 mg de teverelix sobre la respuesta endocrina y ovárica al tratamiento superovulatorio con FSH.

Objetivo

El objetivo y diseño de este experimento fueron establecidos a partir de los resultados obtenidos en el estudio previo. Su finalidad fue determinar el efecto de la administración de una dosis única de 1,5 mg del antagonista de GnRH teverelix, previa a un tratamiento de superovulación con FSH, sobre los perfiles de crecimiento y la funcionalidad folicular durante el periodo de administración de dicho tratamiento, sobre el momento de aparición del celo y del pico preovulatorio de LH, y sobre la tasa de ovulación y el número final de embriones viables en respuesta a la administración de FSH exógena.

Metodología

Protocolo experimental

Este estudio se llevó a cabo utilizando un total de 21 ovejas de raza Manchega, divididas en dos replicados. En el primero se incluyeron 10 individuos en los que se determinó la posible influencia del tratamiento con teverelix sobre el desarrollo de la población folicular, la aparición del celo y del pico de LH, la tasa de ovulación y el número y viabilidad de los embriones obtenidos en respuesta a un tratamiento con FSH; así como las posibles interacciones entre las variables citadas. En el segundo replicado se evaluó, en 11 animales, la repetibilidad de los resultados en lo que a aparición del celo, pico preovulatorio de LH y respuesta superovulatoria se refería.

Para ello, los animales fueron sometidos a un tratamiento de sincronización de celos mediante la administración de 40 mg de un progestágeno (FGA, Chronogest®, Intervet International, Boxmeer, Holanda) por vía intravaginal (Figura 2.4); este día fue considerado como Día -14, ya que se tomó como referencia y Día 0, el de la retirada del progestágeno. Para asegurar el mantenimiento de niveles altos de pro-

gestágeno se utilizaron 2 esponjas por animal, sustituyendo la primera a los 9 días de su inserción. Asimismo, en el Día -2, y para asegurar la lisis de un posible cuerpo lúteo persistente que pudiese alterar el momento de aparición del celo y el pico preovulatorio de LH, se administró una dosis intramuscular de 125 µg del análogo de la prostaglandina F_{2α} cloprostenol (Estrumate®, Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Alemania).

En el Día -5, y en base a los resultados obtenidos en el estudio previo, 6 ovejas del primer replicado y otras 6 del segundo fueron tratadas, por vía subcutánea, con una dosis única de 1,5 mg de Antarelix® en 2 ml de solución salina. El resto de los animales (n=4 y n=5 en el primer y segundo replicado respectivamente) fueron utilizados como grupo control, inyectándoles 2 ml de solución salina por vía subcutánea.

El tratamiento superovulatorio fue administrado a todos los animales y consistió en 8 dosis decrecientes (1,5 ml x 3; 1,25 ml x 2; 1 ml x 3) de FSH ovina purificada (Ovagen™, ICP, Auckland, Nueva Zelanda) por vía intramuscular, con periodos interdosis de 12 h, comenzando en la mañana del Día -2. La retirada del progestágeno se llevó a cabo coincidiendo con la sexta administración de FSH (Día 0).

El estudio de posibles diferencias en la dinámica de crecimiento en respuesta a la administración de FSH, tanto en ovejas tratadas como control, se determinó por observación directa mediante ecografías transrectales realizadas cada 12 h desde la administración de FSH hasta el momento de retirada de la esponja. La funcionalidad folicular se valoró en base a los niveles plasmáticos de inhibina A; para ello, se tomaron muestras de 5 ml de sangre procedente de la vena yugular mediante la utilización de tubos heparinizados al vacío (Vacutainer® Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francia) en los mismos tiempos de realización de las ecografías.

El momento de aparición de la sintomatología de celo se valoró mediante montas controladas con moruecos adultos y entrenados. Coincidiendo con la detección de celos, se llevó a cabo la toma de muestras de sangre (5ml), extraídas de vena yugular de la forma habitual, para la determinación del momento de la descarga preovulatoria de LH.

Finalmente, en el Día 7 después de la retirada del progestágeno, se determinó la tasa de ovulación mediante laparoscopia abdominal para evaluar, por observación directa de los cuerpos lúteos presentes en

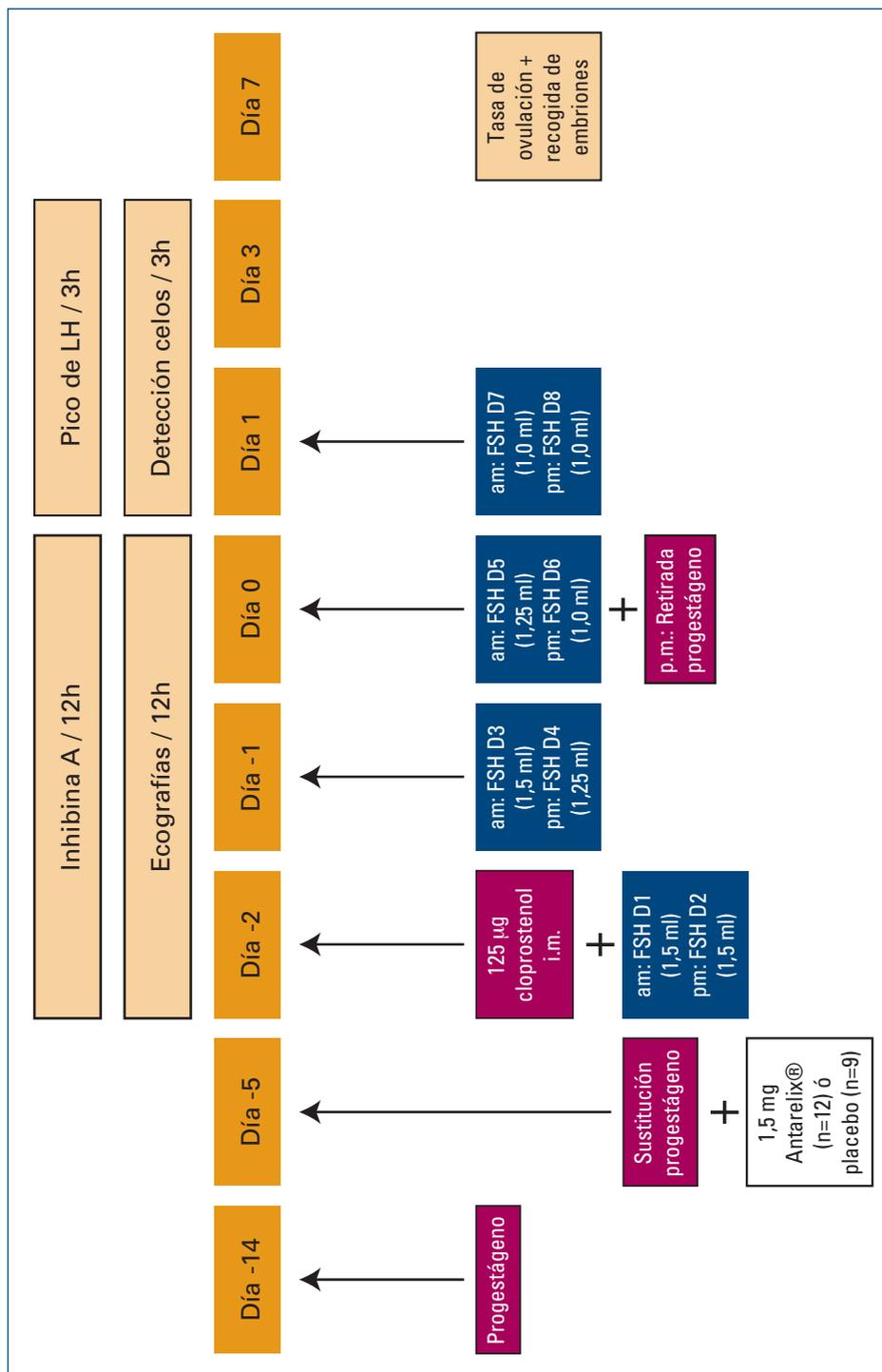


Figura 2.4. Esquema Protocolo Experimental (Experimento 2)

ambos ovarios, el índice de respuesta superovulatoria obtenida con el tratamiento. En las ovejas que presentaron ovulaciones en respuesta al tratamiento se llevó a cabo la recuperación de los embriones mediante lavado retrógrado de los cuernos uterinos; valorándose posteriormente la viabilidad de estos embriones.

Estudio morfométrico de los ovarios y determinación de las concentraciones hormonales en plasma

El estudio morfométrico de los ovarios y la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de LH y de inhibina A se realizaron siguiendo las mismas técnicas descritas en el Experimento I (Figura 2.5).

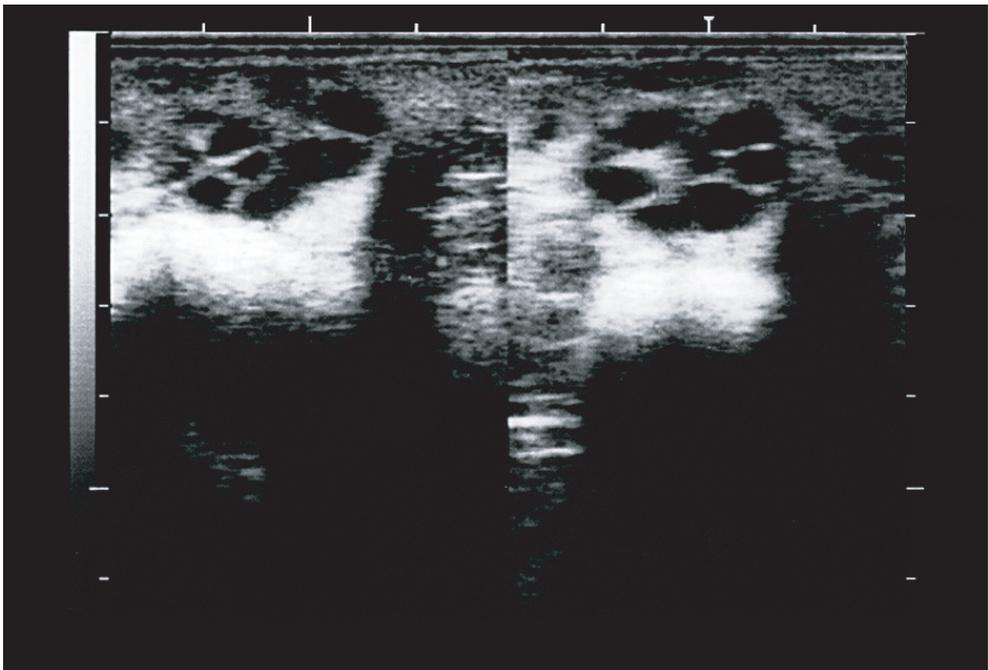


Figura 2.5. Imagen ultrasonográfica característica de la población folicular de una hembra sometida a un tratamiento de superovulación con FSH.



Detección de la aparición de la sintomatología de celo

La detección de celos se realizó de forma individual mediante monta controlada por moruecos adultos y entrenados, cada 3 h desde las 14 a las 60 h posteriores a la retirada del progestágeno. Cuando una hembra presentaba sintomatología de celo, se permitía su cubrición y era aislada en observaciones posteriores; si bien todas las ovejas eran montadas a las 36 ó 48 h de la retirada de la esponja, independientemente de que ya hubieran sido cubiertas con anterioridad. Posteriormente, y durante los dos días siguientes a la segunda monta, todas las ovejas permanecieron con machos en una proporción de un morueco por cada 6 hembras, para asegurar la fertilización de las ovulaciones inducidas.

Determinación de la respuesta ovulatoria

La respuesta ovulatoria fue cuantificada en términos de número de cuerpos lúteos presentes en el ovario, valor estimado mediante observación laparoscópica (Figura 2.6).

Las laparoscopias se llevaron a cabo con una óptica Wolf de 5 mm y 25°. Para ello, bajo anestesia general con xilazina (Rompun®, Bayer Ag, Leverkusen, Alemania, 6 mg i.m.) y clorhidrato de ketamina (Imalgene®

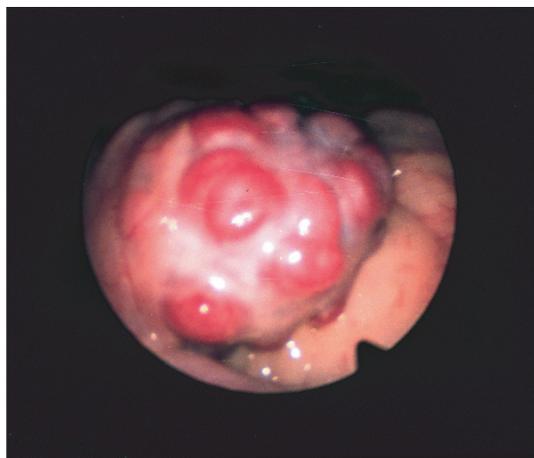


Figura 2.6. Imagen laparoscópica de un ovario de oveja con elevada tasa de ovulación en respuesta a la administración de un tratamiento de superovulación con FSH.

1000, Merial, Lyon, France, 130 mg, i.m.), se colocaba la oveja en decúbito supino sobre una camilla, con una inclinación de 40-45°, y se realizaba una punción con un trócar de 7 mm, cranealmente a la ubre, a una distancia de 2 cm, y a la izquierda de la línea media abdominal; a través del orificio practicado se efectuaba un neumoperitoneo por medio de un compresor con filtro de aire, y se introducía la óptica. En un punto simétrico, en el lado derecho de la línea media, se insertaba el trócar de segunda punción para facilitar la manipulación del

aparato genital mediante una pinza. Una vez determinada la respuesta ovárica, se retiraban ambos trócares, eliminando el neumoperitoneo, sin aplicar ningún tipo de sutura en los orificios practicados, y administrando un antibiótico de amplio espectro (Biomicina®, Laboratorios Ovejero, León, España).

Recuperación y valoración de la viabilidad de los embriones

En las hembras en las que se había evidenciado al menos un cuerpo lúteo, se llevó a cabo la recuperación de los embriones, inmediatamente después de la laparoscopia. Previa laparotomía, se exteriorizó la parte superior del tracto genital y se realizó la recuperación de embriones mediante un lavado retrógrado de los cuernos uterinos con 20 ml de PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado con BSA al 0,2 % (Bovine Serum Albumin, Fraction V, Sigma Chemical Co.) y atemperado a 37°C. Para realizar el lavado se perfundían 20 ml de esta solución en dirección a la unión útero-oviducto, mediante una jeringa conectada a una aguja roma de 1,2 mm de calibre e insertada en la curvatura mayor del cuerno uterino. El medio de lavado era recogido, mediante un catéter de silicona unido a una aguja roma de 0,9 mm fijada con seda en el infundíbulo, en un pocillo de vidrio siliconizado y estéril (Figura 2.7).

La viabilidad embrionaria se evaluaba en función de la competencia de los embriones para continuar su desarrollo, en cultivo *in vitro*, hasta el estadio de blastocisto eclosionado (Figura 2.8). El medio de cultivo utilizado fue TCM 199 (Sigma M-2154) suplementado con un 20 % de suero fetal bovino inactivado (Sigma F-7524) y gentamicina (4 µl/ml) (Sigma G-1397). Éste era mantenido a 38,5 °C, en una atmósfera un 5 % de CO₂ y un 90 % de humedad. El medio de cultivo era renovado cada 2 días, momento en que se evaluaba el estado de desarrollo y la morfología de los embriones mediante observación directa con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300, Tokyo, Japón).

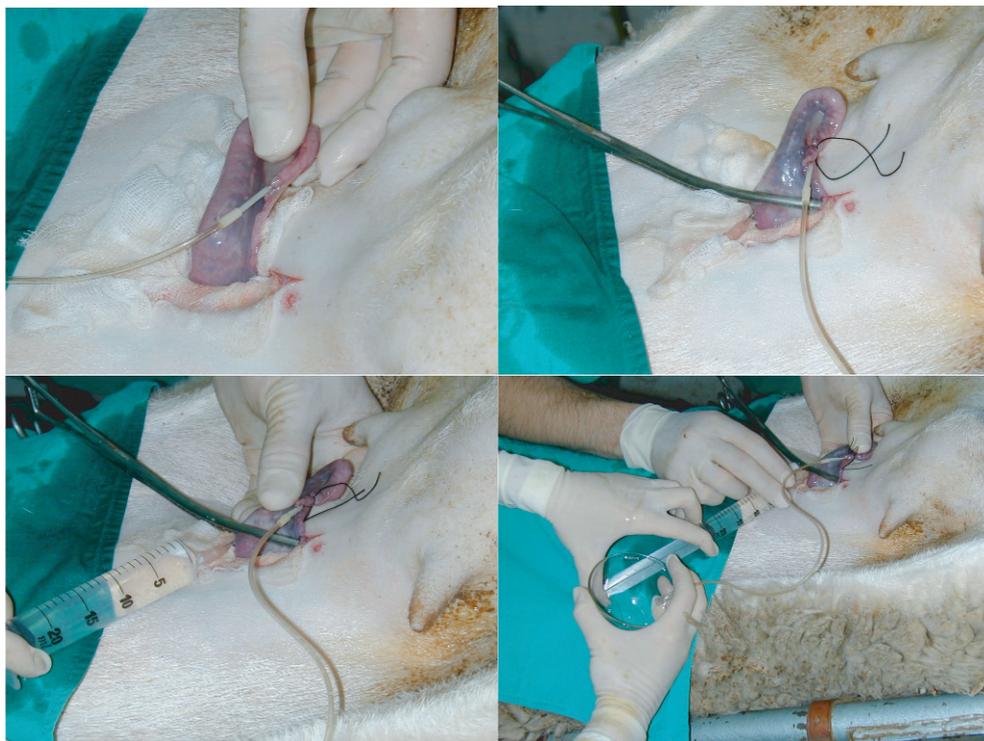


Figura 2.7. Obtención de embriones de útero: 1) Canulación de la unión útero-tubárica en dirección al útero; 2) Introducción del catéter en la curvatura mayor del útero; 3) Lavado desde la curvatura mayor a la unión útero-tubárica 4) Recuperación de los embriones.

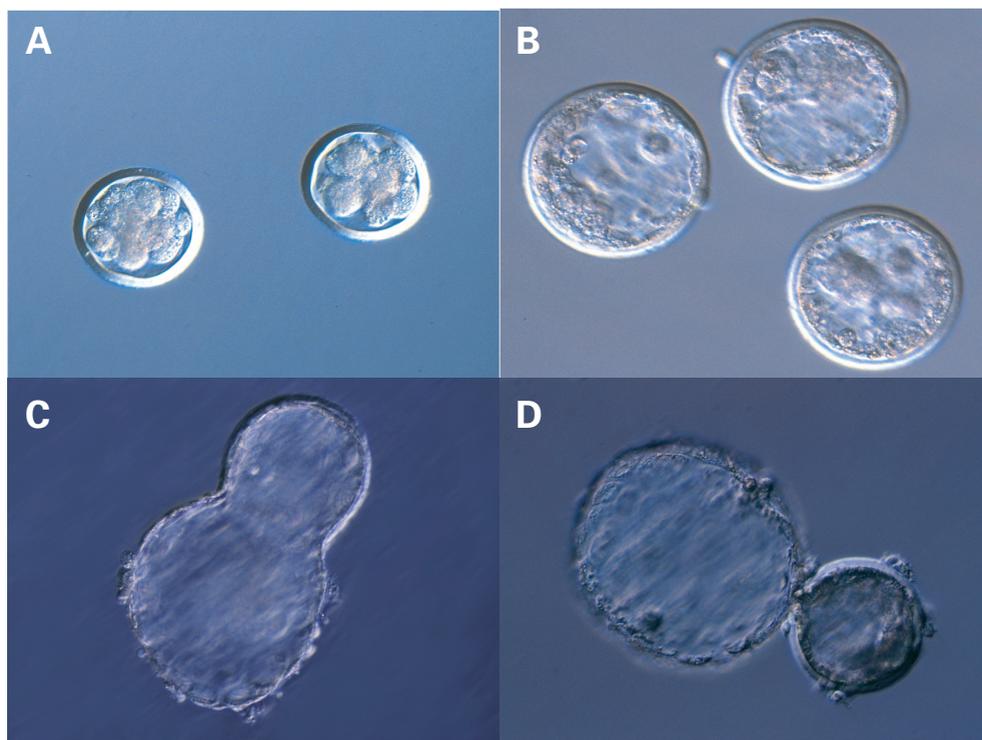


Figura 2.8. Imagen microscópica de embriones recogidos mediante lavado de útero en fase de mórula (A), blastocisto (B) y que posteriormente fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto eclosionando (C) y eclosionado (D).

Análisis de datos

Población folicular

Los datos obtenidos en las observaciones ecográficas de los folículos presentes en los ovarios fueron sometidos a diferentes análisis para valorar los cambios en la población folicular. En un primer análisis se valoró el número total de folículos ≥ 2 mm en desarrollo en cada observación; posteriormente, se clasificó el número total de folículos ≥ 2 mm en tres categorías: folículos grandes (≥ 6 mm), medianos (4-5 mm) y pequeños (2-3 mm) y se valoró el número de folículos de cada una de ellas.

Asimismo, se determinó la evolución en tamaño medio del folículo de diámetro superior (F1) y del segundo en diámetro (F2). Este dato fue



tomado para cada observación, sin considerar la evolución previa ni posterior de cada folículo; cuando existían dos o más folículos que se correspondían con la categoría de F1, el diámetro de F2 se consideraba el del folículo inmediatamente inferior en tamaño a éstos, evitando así valores iguales para F1 y F2.

El seguimiento realizado permitió valorar la dinámica individual de aparición, crecimiento y regresión de cada folículo. A partir de estos datos, en cada observación ecográfica, los folículos localizados por primera vez fueron denominados nuevos o en aparición, los folículos que crecieron en diámetro respecto a la observación anterior se consideraron en crecimiento (entendiendo como folículos totales en desarrollo la suma de las dos categorías anteriores) y los folículos que disminuyeron de tamaño o desaparecieron se consideraron en regresión.

Los efectos del tratamiento y el día de observación sobre el número y tamaño de los folículos fueron estudiados por análisis de varianza (split-plot ANOVA). Los datos se expresaron como media \pm error estándar y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$. La relación entre el día de observación y los cambios en la población folicular fueron analizados mediante análisis de correlación y regresión lineal y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Concentraciones plasmáticas de hormonas

La valoración de los niveles de inhibina A en sangre periférica se realizó de forma individualizada con el fin de evaluar la funcionalidad folicular en cada animal; de igual manera se valoraron los cambios en los niveles de LH para evaluar la funcionalidad hipofisaria y el momento de aparición de la descarga preovulatoria. Los efectos del tratamiento sobre las concentraciones hormonales y la hora de observación del pico preovulatorio de LH fueron valorados por análisis de varianza (split-plot ANOVA). Los datos se expresaron como media \pm error estándar y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$. La relación entre la hora de observación y los cambios en las concentraciones hormonales fueron valorados mediante análisis de correlación y regresión lineal, que fueron consideradas estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

Índices de rendimiento superovulatorio

En cada uno de los animales del estudio se determinaron, por conteo directo, los siguientes parámetros: Número de Cuerpos Lúteos (CL), Número total de Embriones/Oocitos Recuperados (ET), Número de Oocitos No Fertilizados (NF) y Número de Embriones Viables obtenidos tras el cultivo *in vitro* (EV).

A partir de estos parámetros, se calcularon los índices que expresan los resultados del tratamiento de superovulación con FSH: la Tasa de Respuesta Superovulatoria (TRS; porcentaje de hembras que respondieron con 3 ó más Cuerpos Lúteos) y la Tasa de Ovulación (TO; número medio de Cuerpos Lúteos).

La Tasa de Recuperación (TR), se calcula mediante el cociente entre el número total de embriones recuperados y el número total de cuerpos lúteos presentes en los ovarios.

La Tasa de oocitos No Fertilizados (TNF) es el cociente obtenido a partir del número de Oocitos No Fertilizados (NF) y el Número Total de Embriones recuperados y la Tasa de Viabilidad (TV), se estimó mediante la determinación del cociente entre el Número de Embriones Viables y el Número total de Embriones. Todos los parámetros de tipo índice o tasa se expresan, para mayor claridad, como porcentajes.

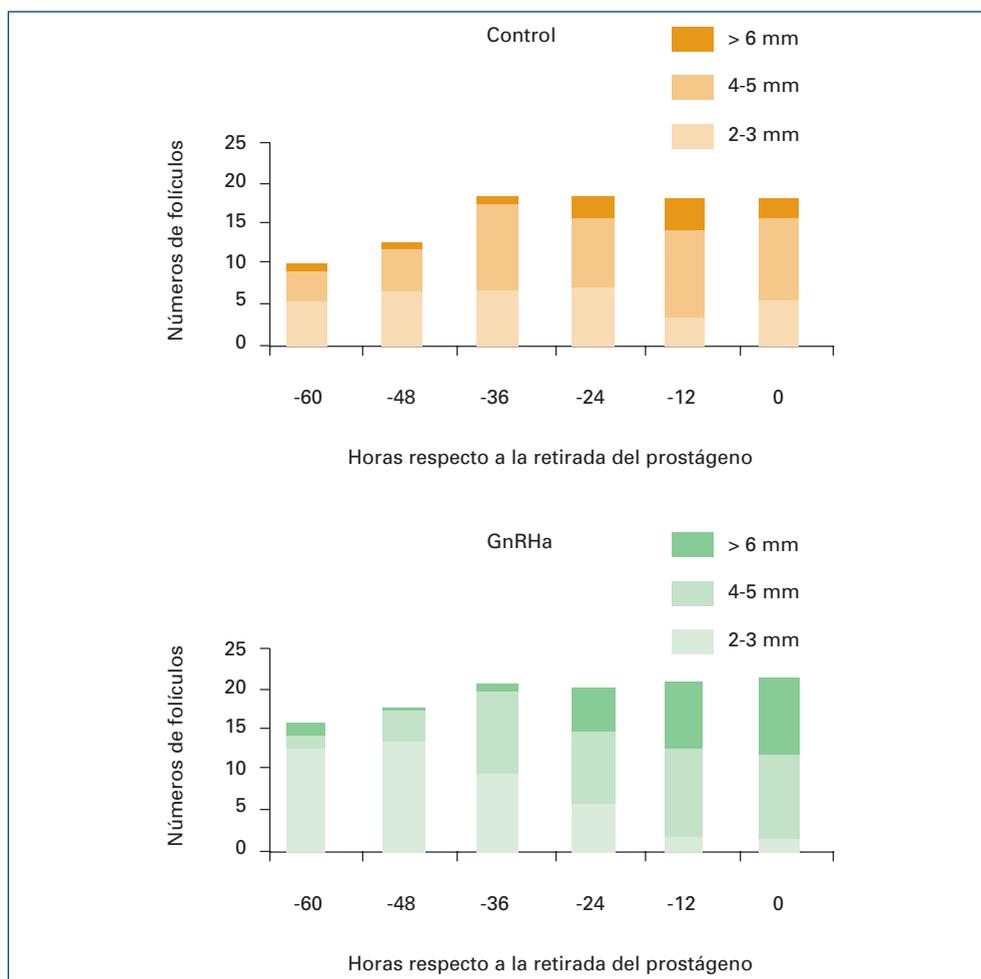
Las comparaciones de estos parámetros entre los grupos tratado y control fueron realizadas por análisis de varianza (ANOVA), los datos se expresaron como media \pm error estándar o porcentaje medio \pm error estándar y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Las posibles relaciones entre los cambios en la población folicular, la aparición de celo y el pico preovulatorio de LH, las concentraciones hormonales y las tasas de rendimiento superovulatorio fueron valorados mediante análisis de correlación y regresión lineal, que fueron consideradas estadísticamente significativas a $P < 0,05$.



Resultados

Desarrollo Folicular en respuesta a la administración de FSH

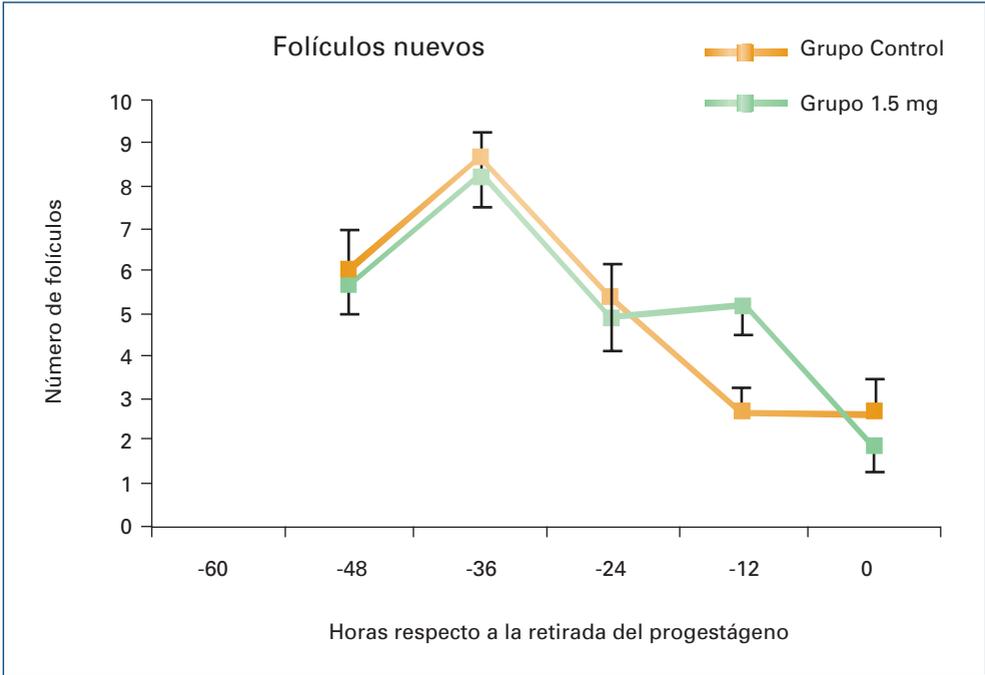
En el momento de iniciar la administración de gonadotropina en el Día -2 (60 h antes de la retirada del progestágeno), los animales tratados con GnRHa tenían un mayor número de folículos de 2-3 mm y un menor número de folículos ≥ 4 mm que los del grupo control ($13,5 \pm 3,8$ vs $5,3 \pm 0,3$; $p < 0,05$ y $2,2 \pm 0,5$ vs $5,0 \pm 0,6$; $p < 0,01$; respectivamente) (Gráfica 2.6).



Gráfica 2.6.- Evolución del número de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (4-5mm) y grandes (≥ 6 mm), durante el tratamiento con FSH en animales control y tratados con 1,5 mg de GnRHa (Tabla A.5).

La administración de FSH produjo un aumento significativo del número de folículos ≥ 4 mm, hasta alcanzar un valor máximo en el momento de la retirada de la esponja; tanto en los animales tratados (de $2,2 \pm 0,5$ a $19,3 \pm 3,8$; $p < 0,0005$) como en los del grupo control (de $5,0 \pm 0,6$ a $12,7 \pm 5,4$; $p < 0,01$). Este crecimiento fue superior en las hembras del grupo tratado; sin embargo, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Por el contrario, el análisis mostró diferencias estadísticas en la población de folículos ≥ 6 mm a las 0 h ($p < 0,005$).

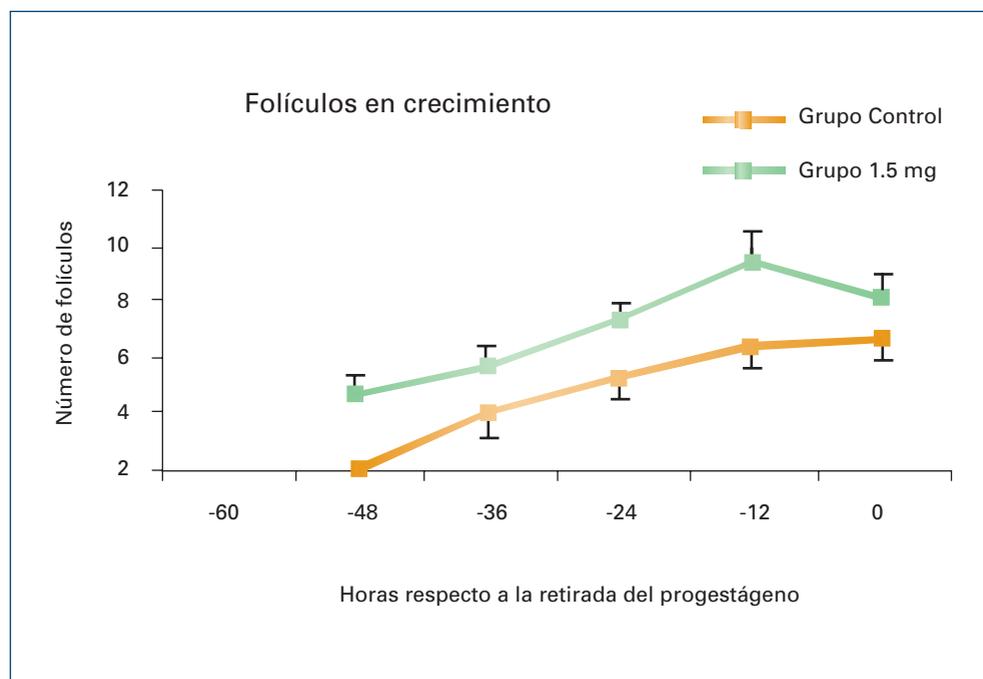
El incremento en el número de folículos ± 4 mm se relaciona directamente con la dinámica de crecimiento folicular. Así, tanto en los animales tratados como en los del grupo control, se produjo un aumento constante del número de folículos reclutados a lo largo del tratamiento con FSH (Gráfica 2.7). En ambos grupos, este número tendió a aumentar entre las -48 y las -36 h de retirada del progestágeno ($p = 0,07$), para disminuir entre las entre las -36 y las 0 h. El análisis estadístico no demostró la existencia de diferencias significativas entre grupos en la



Gráfica 2.7.- Número de folículos nuevos (detectados por primera vez) durante el tratamiento con FSH en animales de los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.6).



dinámica de aparición de nuevos folículos, a pesar de la determinación de un valor superior a las -12 h en los animales a los que se administró el antagonista ($5,2 \pm 0,7$ vs $2,7 \pm 0,6$).

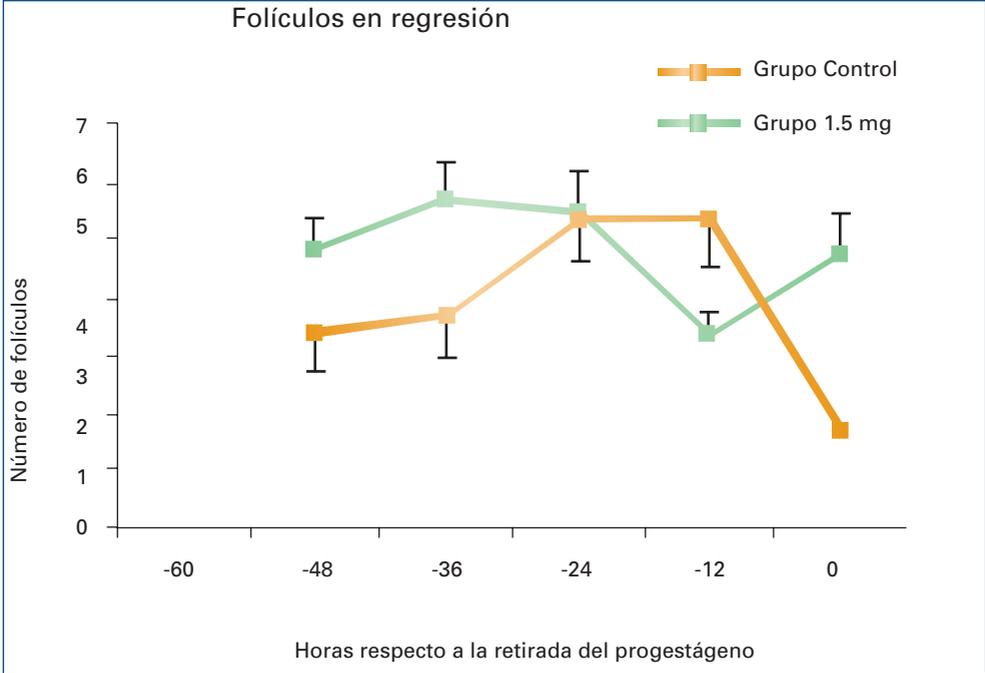


Gráfica 2.8.- Número de folículos en crecimiento durante el tratamiento con FSH en animales de los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.6).

El tratamiento con FSH provocó que los folículos reclutados crecieran en diámetro en ambos grupos; entre las -48 y las -12 h de la retirada de la esponja en los animales a los que se administró el antagonista, y hasta las 0 h en los del grupo control ($p < 0,05$ para ambos casos; Gráfica 2.8). Sin embargo, el número medio de folículos a lo largo del tratamiento fue superior en el grupo tratado que en el control ($7,1 \pm 0,8$ vs $4,9 \pm 0,6$; $p < 0,05$).

La presencia de folículos en regresión indica la existencia de intercambio folicular a lo largo de todo el tratamiento. Entre las -48 h y las -24 h de retirada del progestágeno, el número de folículos en regresión es mayor en el grupo tratado que en el control ($p < 0,05$), invirtiéndose la situación para ambos grupos a partir de este punto (Gráfica 2.9). La media de folículos en regresión en el momento de retirar la esponja fue

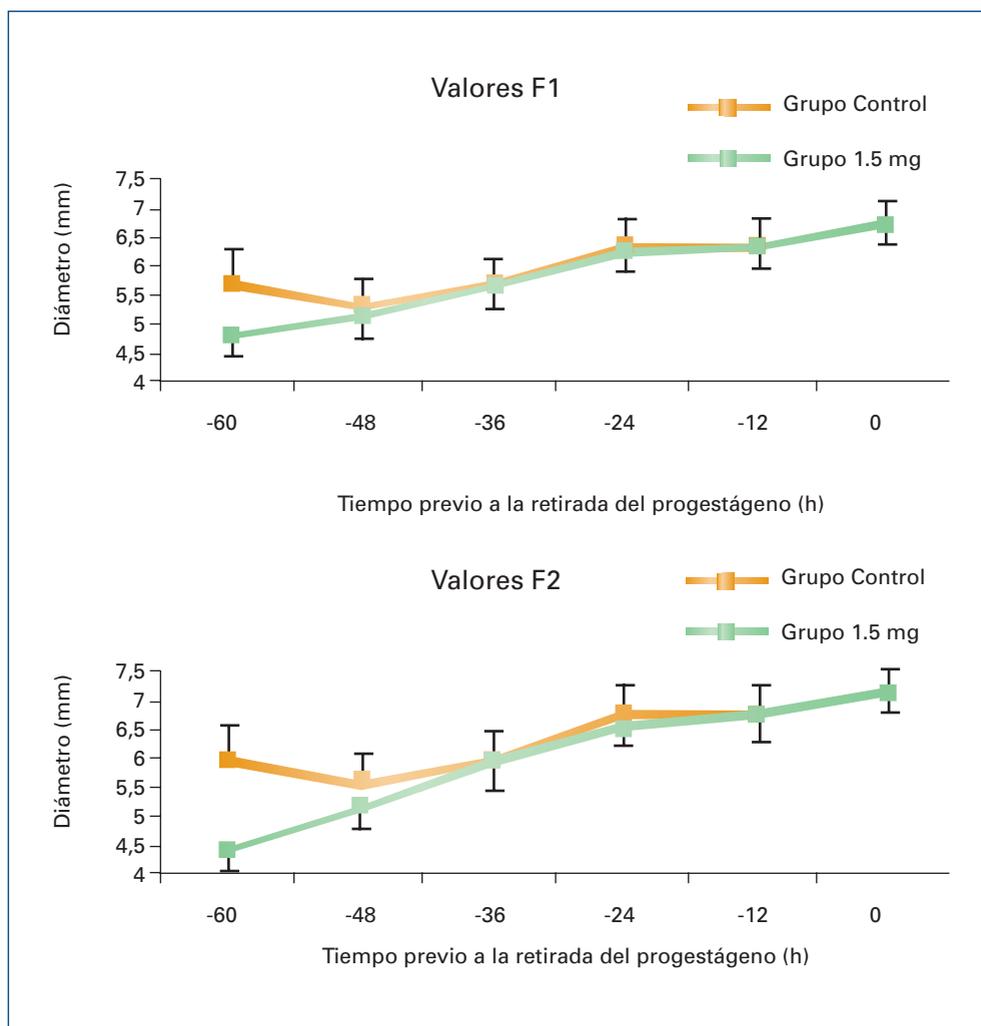
inferior en el grupo control ($1,7 \pm 0,4$) que en el de animales tratados ($4,8 \pm 0,6$; $p=0,05$).



Gráfica 2.9.- Número de folículos en regresión durante el tratamiento con FSH en animales de los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.6).

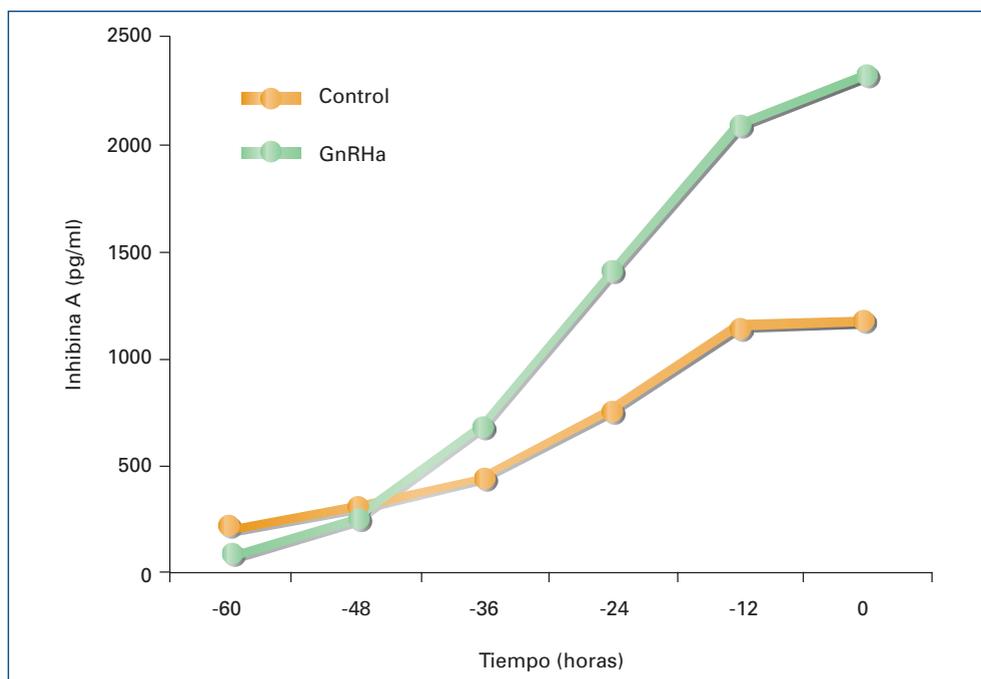
En el momento de iniciarse la administración de FSH, los valores correspondientes a F1 y F2 son inferiores en el grupo de animales tratados que en el grupo control ($4,83 \pm 0,35$ vs $5,67 \pm 0,62$ mm; $p= 0,08$ en el caso de F1 y $3,33 \pm 0,29$ vs $4,67 \pm 0,62$ mm; $p<0,05$ para los valores de F2; Gráfica 2.10). Durante la administración de la gonadotropina se observan crecimientos paralelos y progresivos en ambos grupos ($p<0,0005$ y $p< 0,0001$ en el caso de F1 y F2 del grupo control; $p<0,0005$ para F1 y F2, del grupo tratado con teverelix); sin apreciarse diferencias significativas entre grupos.

El análisis de la funcionalidad de estos folículos mediante la determinación de las concentraciones de inhibina A (Gráfica 2.11), mostró valores más bajos en los animales del grupo tratado con teverelix respecto al grupo control en el momento de iniciar el tratamiento con FSH ($p<0,05$). En ambos grupos, los niveles medios de la hormona aumentaron signi-



Gráfica 2.10.- Diámetro del foliculo de mayor tamaño (F1) y del segundo en tamaño (F2) en cada una de la observaciones realizadas durante el tratamiento con FSH en animales de los grupos control y tratado con 1,5 mg de tenerlix (Tabla A.7).

ficativamente a lo largo del tratamiento ($p < 0,0001$), sin observarse diferencias significativas entre grupos a las -48, -36 y -24 h respecto a la retirada del progestágeno, pero alcanzándose niveles más elevados en los individuos tratados a las -12 y 0 h ($p < 0,0001$). No se evidenció correlación entre el incremento de los niveles hormonales y el número de folículos de las distintas categorías, a excepción de la relación existente con el número de folículos grandes a las -12 y 0 h ($p < 0,05$).



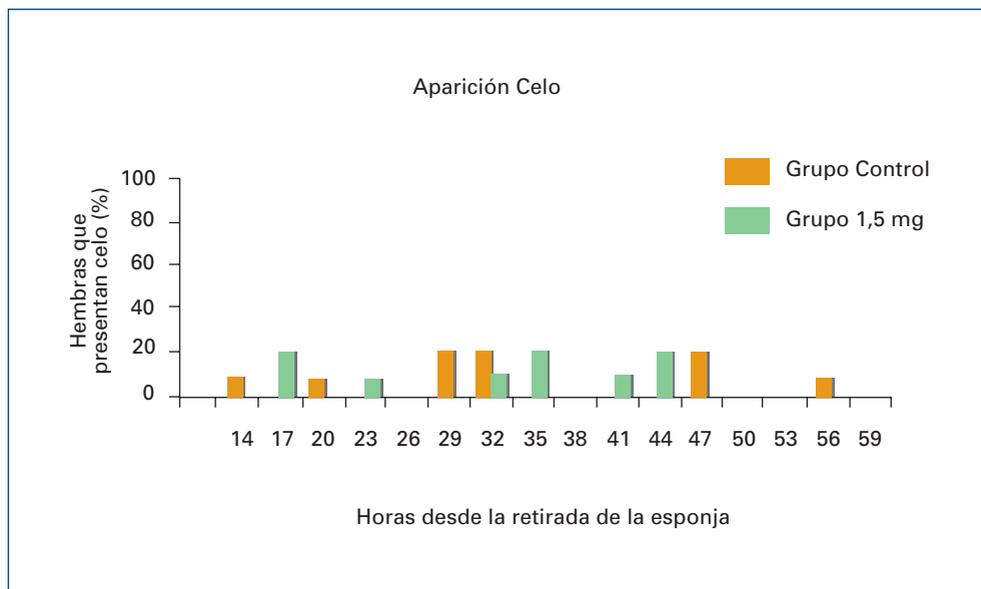
Gráfica 2.11.- Concentraciones medias de Inhibina A (pg/ml) durante el tratamiento con FSH en animales de los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.8).

Aparición del celo y pico preovulatorio de LH

El tratamiento con antagonistas de GnRH no afectó de forma significativa a la aparición de la sintomatología de celo. Así, de un total de 12 ovejas tratadas con teverelix, tres (25%) no presentaron celo como consecuencia de la retirada del progestágeno intravaginal mientras que en el grupo control todos los individuos presentaron sintomatología de celo (100%). En el resto de los animales tratados, el celo se detectó entre las 17 y las 44 h posteriores a la retirada de la esponja ($34,0 \pm 1,2$ h) siendo este dato muy similar al observado en los animales control (rango: 14-56 h, media: $32,0 \pm 1,1$ h; Gráfica 2.12).

Las hembras del grupo tratado con antagonista de GnRH que no presentaron celo tenían un número menor de folículos medianos a las -48 h ($p < 0,01$) y de folículos grandes a las -24 h ($p < 0,01$). En estos animales también se obtuvieron valores inferiores en F1 y F2 a las -12 h ($p = 0,06$).

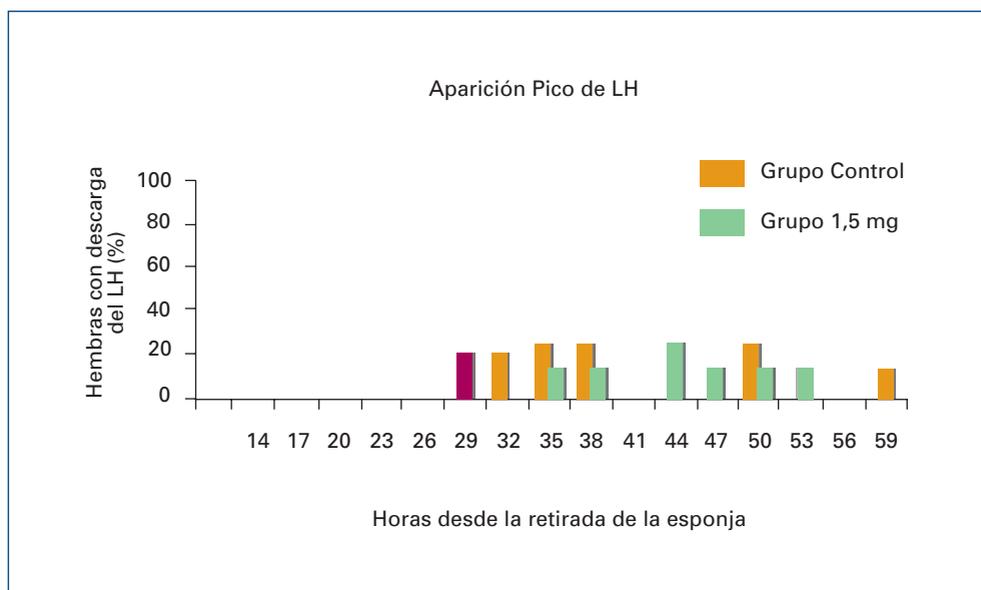
En los animales tratados, se observó que un mayor número de folícu-



Gráfica 2.12.- Porcentaje de hembras que presentaron sintomatología de celo después de la retirada del progestágeno para los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.9).

los pequeños (2-3 mm) al inicio del tratamiento con FSH (concretamente, entre las -60 y -48 h respecto a la retirada del progestágeno) estaba relacionado con una aparición más temprana de la sintomatología de celo ($p < 0,005$ y $p < 0,05$, respectivamente). La aparición del celo era favorecida también por un mayor número total de folículos en desarrollo (nuevos + en crecimiento) a las -36 h ($p < 0,005$) y -24 h y 0 h ($p < 0,05$ en ambos casos) y por el número de folículos medianos a las -12 y 0 h ($p < 0,05$ en ambos casos), respecto a la retirada del progestágeno.

La descarga preovulatoria de LH, responsable de la posterior ovulación, se detectó en el 88,9 % de los animales control y en el 66,7 % de los tratados. En el grupo control, la aparición del pico de LH tuvo lugar entre las 32 y las 59 h posteriores a la retirada del progestágeno, siendo el tiempo medio de aparición $42,5 \pm 1,4$ h (Tabla A.10); en el grupo de animales tratados con teverelix, el tiempo medio fue de $42,5 \pm 1,5$ h, con un rango de 29-53 h; Gráfica 2.13). El intervalo medio entre la aparición del celo y la aparición del pico de LH fue de $6,0 \pm 0,8$ h (con un rango de 3 a 18 h) en el caso de los animales control y de $10,7 \pm 1,0$ h (con un rango de 3 a 33 h) si se había administrado con anterioridad el antagonista de GnRH.



Gráfica 2.13.- Porcentaje de hembras que presentaron descarga preovulatoria de LH después de la retirada del progestágeno para los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix (Tabla A.9).

El estudio de posibles relaciones entre la población folicular y la presencia o ausencia de pico de LH mostró que, al igual que sucedía al analizar la aparición de celos, los animales que no presentaron dicho pico tenían un número menor de folículos medianos a las -48 h ($p < 0,01$), de folículos grandes a las -24h ($p < 0,001$) y un menor diámetro de F1 y F2 a las -12 h ($p = 0,06$).

El tiempo de aparición del pico de LH estuvo también determinado por la dinámica de crecimiento folicular durante el tratamiento con FSH. Así, un mayor número de folículos nuevos incorporados a las -48 y -36 h ($p < 0,05$) y un mayor número total de folículos en desarrollo (folículos nuevos + folículos en crecimiento) a las -36 h ($p = 0,06$) estaban relacionados con una aparición de la descarga más temprana. Una mayor actividad secretora de los folículos, en términos de inhibina A, en el momento del inicio del tratamiento con FSH estuvo relacionada con una aparición más temprana de la descarga preovulatoria de LH.



Respuesta Superovulatoria

Siete de 9 animales del grupo control (77,8 %) ovularon en respuesta al tratamiento siendo el número medio de cuerpos lúteos $9,6 \pm 0,8$ (Tabla 2.2). En el grupo de ovejas tratadas con antagonista se produjeron dos situaciones diferentes: 4 de los 9 animales que presentaron síntomas de celo no mostraron respuesta ovulatoria mientras los otros 4 (50,0 %) respondieron al tratamiento con una tasa de ovulación media de $12,2 \pm 1,1$ cuerpos lúteos. En los animales tratados que ovularon en respuesta al tratamiento de superovulación, el número medio de embriones recuperados fue de $9,7 \pm 1,0$, cifra superior al grupo control ($7,6 \pm 0,9$), con tasas de recuperación más altas en el grupo de ovejas tratadas con el antagonista de GnRH ($81,4 \pm 19,4$ vs $65,7 \pm 24,1$ %).

La tasa de viabilidad de los embriones tras el cultivo *in vitro* alcanzó el $70,9 \pm 23,7$ y $50,9 \pm 26,1$ % en el grupo tratado y control, respectivamente; así, el número de embriones transferibles fue superior en los animales a los que se administró teverelix que en los animales control ($7,3 \pm 1,1$ vs $3,3 \pm 0,8$; $p < 0,05$).

La comparación del momento de aparición del celo y de la descarga de LH entre los animales que ovularon y los que no lo hicieron, aún presentando pico de LH, muestra un retraso de 12 h en la aparición de dicho pico en el grupo de animales que no ovularon ($36,5 \pm 1,24$ vs $48,5 \pm 0,98$; $p < 0,001$).

	Control	GnRH α
Tasa de ovulación (n)	$9,6 \pm 0,8$	$12,2 \pm 1,1$
Número de embriones totales (n)	$7,6 \pm 0,9$	$9,7 \pm 1,0$
Tasa de recuperación (%)*	$65,7 \pm 24,1$	$81,4 \pm 19,4$
Número de oocitos no fertilizados (n)	$2,3 \pm 1,0$	0
Tasa de no fertilización (%)	$27,0 \pm 20,0$	0
Número de embriones viables (n)*	$3,3 \pm 0,8$	$7,3 \pm 1,1$
Tasa de viabilidad (%)*	$50,9 \pm 26,1$	$70,9 \pm 23,7$

Tabla 2.2





Discusión



Discusión

En la actualidad, y como se ha descrito en la introducción de este trabajo, se considera que la presencia de folículos dominantes en el momento de iniciar un tratamiento de superovulación constituye uno de los principales factores limitantes de la respuesta en protocolos de producción de embriones, tanto *in vivo* (González-Bulnes *et al.*, 2002b) como *in vitro* (Roche, *et al.*; 2004). Así, cabría suponer que la eliminación de los folículos de tamaño igual o superior a los 6 mm podría evitar este efecto negativo sobre la respuesta al tratamiento y por ello fue uno de los objetivos de este trabajo.

Los resultados del primer experimento llevado a cabo en nuestro trabajo demuestran que la administración por vía subcutánea del antagonista de GnRH teverelix, en dosis únicas (1,5 y 3,0 mg), podría ser útil en la inducción de este efecto, ya que su uso evitó la presencia de folículos de gran tamaño. Esta acción estaría causada por la capacidad de los antagonistas para actuar sobre los receptores hipofisarios de GnRH que, por bloqueo competitivo, provocan una inhibición de la secreción de hormona luteinizante (Coccia, 2004). Previamente se ha demostrado que la LH es necesaria, en concentraciones elevadas, para que se establezca dominancia (Campbell, 1990 y 1995).

El perfil de secreción de LH observado en el presente estudio confirmaría esta hipótesis. Los resultados muestran que la administración del antagonista produjo una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas medias de esta hormona. El diferente efecto de las dos dosis utilizadas sobre los niveles medios de LH, aunque permite también establecer una relación dosis dependiente para teverelix (12,7 % y 25,4 % de inhibición de LH para las dosis de 1,5 y 3,0 mg respectivamente), es inferior al 70% de efecto medio descrito para dosis submaximales de GnRHa por otros autores en la especie humana (Huirne y Lambalk, 2001; Coccia, 2004). Por otro lado, ambas dosis provocaron la ausencia total de pulsatilidad en la secreción de LH durante los periodos de tiempo en que se llevó a cabo el estudio detallado de este parámetro. Los datos indican que la administración de una dosis única (1,5 ó 3,0 mg) por vía subcutánea de teverelix inhibe la función hipofisaria en lo que a secreción de LH se refiere, durante al menos 48 h.

Yildiz *et al.* (2002) y McNeilly (1992) han descrito niveles plasmáticos medios de LH en ovejas superiores a los encontrados en este trabajo en los animales del grupo control (1,6 vs 0,63 ng/ml). Un menor valor para los parámetros de LH (concentraciones medias de LH, efecto del antagonista sobre el perfil de secreción de LH y frecuencia y amplitud de los pulsos de LH) tanto en los animales del grupo control como en las hembras tratadas con un antagonista de GnRH, se explicaría por el efecto inhibitorio de los progestágenos sobre la secreción de LH (Goodman y Karsh, 1980). Todo ello confirma la adecuación de nuestro diseño experimental, en cuanto a la reproducibilidad de las condiciones del experimento con cualquier protocolo de superovulación y, por tanto, con la segunda parte de nuestro trabajo experimental.

El seguimiento de la población folicular muestra también que la administración de teverelix conduce a un aumento significativo del número de folículos de pequeño tamaño (2-3 mm), sin observarse diferencias significativas entre las dos dosis administradas. Estos folículos son ya gonadotropo-receptivos y capaces, por tanto, de responder a un tratamiento posterior con FSH exógena (Campbell, 1995). En este caso, las hembras no eran sometidas a tratamiento superovulatorio, por lo que no recibían aporte de FSH exógena y, además, sufrían una disminución de síntesis y liberación endógena de esta gonadotropina como efecto del GnRHa administrado. Por tanto, el incremento observado sobre el número de folículos de 2-3 mm sería consecuencia de la eliminación de los folículos dominantes, pero independiente de la FSH.

El análisis por categorías de la población folicular permite concluir que es durante los Días 2 y 3 postratamiento cuando, desde el punto de vista morfológico, se consigue la población folicular idónea en cuanto a número elevado de folículos de pequeño tamaño y ausencia de folículos dominantes para la posterior administración de un tratamiento superovulatorio. Sin embargo, los datos morfológicos no son indicativos de la funcionalidad folicular; por ello, en nuestro estudio se han considerado también la valoración de hormonas foliculares, en este caso, inhibina A. En los resultados de este análisis no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos durante los Días 2 y 3 después del tratamiento con FSH; por tanto, con ambas dosis, parece que los folículos mantendrían la funcionalidad hasta el tercer día. Sin embargo, a partir de este momento, mientras en el caso de la administración de 1,5 mg se mantienen los niveles de inhibina A, en el caso de la dosis superior, a partir del Día 3 se produce una disminución drástica de los valores de



esta hormona hasta alcanzar su mínimo el Día 4,5. De los datos anteriores podríamos concluir que en el caso de un tratamiento con la dosis superior de *teverelix*, aún cuando durante el Día 4 el número de folículos capaces de responder desde el punto de vista del estadio de desarrollo es superior al de los días anteriores, éstos presentan cierta alteración en cuanto a su funcionalidad.

Elevadas concentraciones de inhibina A (secretada por folículos de gran tamaño) inducen una disminución en la secreción de FSH (Martin et al., 1988), mediante un mecanismo de *feed-back* negativo sobre la hipófisis. Así se establece una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de ambas hormonas, que podría explicar las diferencias encontradas entre los distintos grupos para las concentraciones medias de inhibina A en el momento de la administración del antagonista (122,38; 235,60 y 140,81 ng/ml para los grupos control, 1,5 y 3,0 mg, respectivamente) y en los niveles de partida de FSH, así como en su evolución posterior. Estas diferencias en el momento de inicio del tratamiento estarían causadas por la aleatoriedad en la distribución de los animales entre los tres grupos. En este caso, se produjo la circunstancia de que los animales del grupo control y del grupo tratado con 3 mg, se encontraban mayoritariamente en el inicio de una onda de crecimiento folicular, con niveles de FSH en incremento y con bajos niveles de inhibina A, mientras los animales del grupo tratado con 1,5 mg se encontraban en fase bien de selección, bien de dominancia folicular; con niveles de inhibina A muy altos y, con ello, niveles de FSH muy bajos. Sin embargo, el tratamiento funcionó en ambos grupos. En la evolución natural de las hembras tratadas con 1,5 mg debería producirse una onda de liberación de FSH en algún momento del periodo de observaciones, hecho que no se produjo. En todo caso, otro factor a tener en cuenta es que la liberación de FSH, al contrario que en el caso de la LH, presenta un componente de liberación episódica cuya regulación es totalmente independiente de GnRH (Padmanabhan y McNeilly, 2001).

El análisis detallado de los efectos de ambas dosis de *teverelix* indica que existe un efecto dosis dependiente sobre la secreción de LH. Sin embargo, los datos obtenidos en cuanto a población y funcionalidad folicular recomiendan la utilización, en protocolos de superovulación, de la dosis más baja (1,5 mg) con el fin de evitar posibles efectos negativos sobre la capacidad de desarrollo posterior de los folículos reclutados; a ello, se uniría el menor coste económico de la dosis de 1,5 mg.

En lo que al momento óptimo para la administración del tratamiento se refiere, podemos concluir que es durante los Días 2 y 3 cuando los folículos alcanzan la situación que parecería más apropiada para responder a la administración de FSH, por lo que la administración de una única dosis de teverelix, incorporada a un protocolo de superovulación, debería realizarse 3 días antes del inicio de la administración de FSH exógena.

Los resultados del análisis morfométrico de los ovarios realizado al iniciar el aporte de FSH exógena durante el experimento 2, nos permitieron confirmar los resultados del primer estudio. Así, de nuevo se observaba que la población folicular, al inicio del tratamiento con FSH exógena, presentaba un número incrementado de folículos gonadotropo-receptivos con un tamaño de aproximadamente 2-3 mm (13,5 vs 5,3 folículos del grupo control), sin presencia de folículos dominantes en los animales tratados con teverelix.

Además, estos folículos de pequeño tamaño del grupo tratado eran capaces de crecer más rápidamente en respuesta a la administración de FSH que los folículos de los animales a los que no les fue administrado el GnRH α . Así, el número de folículos ≥ 4 mm (susceptibles por tanto de ovular) así como la actividad de esta población (determinada por las concentraciones de inhibina A en plasma) aumentaban más rápidamente en los animales tratados que en los del grupo control, alcanzando estos parámetros sus valores máximos en el momento de la retirada del progestágeno.

En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre grupos en el total de folículos con un tamaño igual o superior a los 4 mm, y por tanto con capacidad para ovular tanto en ciclos naturales (McNeilly, 1986), como superovulados (González-Bulnes *et al.*, 2000). Sin embargo, un análisis desglosado por categorías pone en evidencia que para el número total de folículos ≥ 6 mm (con máximas posibilidades para alcanzar la ovulación) sí se podían observar diferencias significativas entre el grupo de animales tratados y el grupo control. Es decir, todo parece indicar que el tratamiento con teverelix mejora el perfil de crecimiento de los folículos preovulatorios desarrollados en respuesta al tratamiento superovulatorio con FSH.

En ambos grupos los cambios en la dinámica folicular como consecuencia del tratamiento de FSH indicaban que la incorporación de folí-



culos alcanza su valor máximo a las -36 h de retirada del progestágeno, momento a partir del cual el número de folículos reclutados desciende para ambos grupos de forma paralela. Estos folículos reclutados crecían en diámetro con la administración de la gonadotropina en las hembras de ambos grupos, pero el número de folículos en crecimiento al final del tratamiento era superior en los animales que habían recibido antagonista de GnRH (7,1 vs 4,9 del grupo control). La presencia de folículos en regresión se observaba a lo largo de todo el tratamiento, pero en el momento de la retirada del progestágeno el número de folículos en regresión era superior en los animales tratados (4,8 vs 1,7 en los animales control). Como consecuencia se podría indicar que la ausencia de folículos dominantes en el momento de iniciar un tratamiento de superovulación producía un incremento en el intercambio folicular en respuesta a la FSH; es decir, aumentaba el número de nuevos folículos reclutados pero también aumentaba el número de folículos que experimentan atresia. Este efecto limitador de los folículos dominantes sobre el intercambio folicular ha sido previamente descrito, tanto para vacuno (Fortune *et al.*, 1994), como ovino (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2001).

Como hemos visto anteriormente, un incremento en el número de folículos preovulatorios en el momento de la retirada de progestágeno no es suficiente para conseguir un mejor rendimiento del protocolo de superovulación; sería necesario que los folículos que, desde el punto de vista de tamaño y características morfológicas, parecen proporcionar una situación ovárica ideal, sean también funcionales. En pequeños rumiantes ya ha sido descrita la relación directa entre las concentraciones de inhibina y la respuesta posterior al tratamiento de superovulación, tanto en ovejas (González-Bulnes, 2002b) como en cabras (González-Bulnes, 2004a). En nuestro trabajo se observó que, aunque en el momento de iniciarse el tratamiento con FSH los animales tratados con teverelix partían de valores más bajos de inhibina A y durante todo el tratamiento no se observaban diferencias significativas para ambos grupos, en el momento de retirada del progestágeno la concentración plasmática de esta hormona era superior en el grupo tratado con GnRHa que en los animales del grupo control.

Los momentos de aparición de los síntomas del celo y de la descarga preovulatoria de LH en los animales del grupo tratado con GnRHa fueron semejantes a los del grupo control (32,0 vs 34,0 h y 42,5 vs 42,5 h para el celo y pico de LH respectivamente). Así mismo, ambos

grupos mostraron una elevada variabilidad individual para ambos parámetros (17 - 44 h vs 14 - 56 h para el celo y 29 - 53 vs 32 - 59 h para la descarga de LH); esta característica, común a todos tratamientos superovulatorios (Cognie *et al.*, 2003), complica el manejo reproductivo de estos animales.

Atendiendo al rendimiento final del protocolo, valorado en función del número de embriones viables para su transferencia a una hembra receptora, los animales tratados presentaron un comportamiento bimodal, por lo que fueron divididos en dos subgrupos. Así, en nuestro estudio pudimos observar la existencia de un grupo de animales que mejoraban los resultados obtenidos para el grupo control, mientras había otro grupo en el que no se obtenían ovulaciones después del tratamiento de superovulación.

En los animales que respondieron, los rendimientos podían considerarse mejorados sobre el grupo control ya que la tasa de ovulación (12,2 vs 9,6 cuerpos lúteos del grupo control) y el número de embriones viables adecuados para ser transferidos resultaron significativamente mayores en las ovejas tratadas con teverelix (7,3 vs 3,3).

En contraste con los buenos resultados observados en el grupo de animales tratados que respondieron a la administración de FSH, las hembras restantes del grupo tratado no ovularon. La ausencia de ovulación en estos animales podría deberse bien a alteraciones en el crecimiento folicular obtenido como respuesta a la administración de FSH o bien a la existencia de algún tipo de alteración endocrina en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, que condicionaría la liberación de LH. La primera hipótesis se basa en el hallazgo, mediante análisis individual de los datos de crecimiento folicular, de una menor tasa de crecimiento de los folículos en respuesta a la FSH exógena en los animales tratados que posteriormente no respondieron.

El análisis de las concentraciones preovulatorias de LH muestra que, mientras en un 50% de los animales que no ovularon no se detectó la aparición de la descarga preovulatoria de LH; en el otro 50%, aunque sí se observa descarga preovulatoria de LH, no hubo ovulación. En el primer caso, la alteración en los niveles de LH es evidente; en el segundo, se podría pensar que los folículos no fueron capaces de ovular en respuesta al pico de LH. Esto puede deberse a alteraciones del folículo en sí mismo o a que, si bien, se produjo el pico de LH, existían alteracio-



nes en la pulsatilidad de esta hormona previas a esta descarga. Esta hipótesis podría confirmarse por el hecho de que, en estos animales, la descarga de LH apareció casi 12 h más tarde que en el grupo de animales tratados que sí presentaban ovulación.

La secreción pulsátil de LH, con pulsos de elevada frecuencia y baja amplitud, es imprescindible en las horas previas a que se produzca la ovulación puesto que de ella dependen el crecimiento y la maduración finales del folículo o folículos preovulatorios y la aparición de la descarga o pico preovulatorio de LH, requisitos ambos indispensables para que tenga lugar la ovulación (Cumming *et al.*, 1971, Uilenbroek *et al.*, 1980). Los bajos niveles de LH son inducidos de manera directa por la administración del antagonista de GnRH teverelix como ya fue descrito en el experimento 1. También se observó la desaparición de pulsatilidad en la secreción de LH durante 48 h postratamiento, pero no podemos descartar que este efecto se prolongue más de este periodo de 2 días. Este efecto se vería aumentado en hembras tratadas con dosis altas de FSH ya que la administración de FSH exógena, por un mecanismo de feed-back negativo, disminuiría la secreción de LH a nivel de la hipófisis, como se ha demostrado recientemente en ovejas superovuladas (Kendall *et al.*, 2004).

En conclusión, en los animales que responden a un tratamiento superovulatorio después de la administración de un antagonista de GnRH el número de embriones viables es mayor; sin embargo, existe un alto porcentaje de animales en los que, a pesar de producirse crecimiento folicular hasta tamaños preovulatorios en respuesta a la FSH, no se obtienen ovulaciones. Los resultados obtenidos parecen indicar que este efecto podría relacionarse con una persistencia de los efectos del antagonista de GnRH sobre la secreción endógena de LH. Por ello, su aplicación en protocolos de producción de embriones in vivo precisaría del estudio de tratamientos superovulatorios alternativos. Sin embargo, este tratamiento podría ser perfectamente aplicable en protocolos de producción de embriones in vitro, en los que la maduración folicular preovulatoria y la ovulación no son necesarias y para los cuales los niveles de LH no son determinantes puesto que la maduración de los oocitos se produce en el laboratorio.





Conclusiones



Conclusiones

1. La administración subcutánea de dosis únicas (1,5 y 3,0 mg) del antagonista de GnRH teverelix ejerce un efecto dosis-dependiente sobre la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, disminuyendo los niveles plasmáticos medios e inhibiendo la pulsatilidad de LH durante al menos las 48 h posteriores a su administración.
2. La acción ejercida por el antagonista de GnRH sobre la secreción de LH inhibe el efecto de dominancia folicular y permite un aumento significativo del número de folículos gonadotropo-receptivos de pequeño tamaño (2-3 mm), alcanzándose el efecto máximo alrededor del tercer día tras el tratamiento; sin embargo, estos folículos secretan menor cantidad de inhibina A, en los animales tratados con la dosis más alta (3,0 mg).
3. Los folículos gonadotropo-receptivos obtenidos después de la administración de una única dosis de 1,5 mg de antagonista de GnRH, tres días antes de la administración de un protocolo de superovulación, son capaces de crecer hasta tamaños preovulatorios en respuesta a la administración de FSH exógena.
4. El rendimiento final de un protocolo de superovulación y recogida de embriones *in vivo* en el que se incluye un antagonista de GnRH se ve afectado por un comportamiento bimodal, con un grupo de animales que mejoran los resultados obtenidos en el grupo control y otro grupo en el que no se obtienen embriones por falta de ovulación en las hembras donantes.
5. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento propuesto podría ser incorporado en protocolos de producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, su aplicación en protocolos de producción de embriones *in vivo* precisaría el desarrollo de estudios orientados a su modificación, previa identificación de los factores causales de anovulación.





Resumen y Summary



Resumen

La población folicular, en cuanto a número y distribución por tamaño de los folículos en el momento de iniciar un tratamiento de superovulación con FSH, parece ser uno de los factores responsables de la alta variabilidad obtenida en las técnicas de superovulación y transferencia de embriones. La presencia de folículos de gran tamaño, susceptibles de ejercer dominancia, antes de la estimulación ovárica se relaciona negativamente con la respuesta obtenida al tratamiento. Así, la situación ovárica ideal en el momento de iniciar los tratamientos de superovulación consistiría en una población folicular formada por el mayor número posible de folículos con un tamaño aproximado de 2-3 mm, sin actividad estrogénica pero con elevada capacidad de respuesta frente a las gonadotropinas hipofisarias, en ausencia de folículos dominantes. Puesto que la dominancia sólo se establece en presencia de altas concentraciones de hormona luteinizante (LH), la inducción de bajos niveles plasmáticos de esta hormona antes del inicio del tratamiento con FSH podría ser una forma eficaz de mejorar los resultados de los protocolos de superovulación. Esta situación puede conseguirse mediante la utilización de antagonistas de GnRH que, por bloqueo competitivo, producen una supresión inmediata y reversible de la secreción de gonadotropinas hipofisarias.

En base a estas consideraciones, el presente trabajo tenía como objetivo valorar la inclusión del antagonista de GnRH *teverelix*, en un protocolo de superovulación y transferencia de embriones para poder sentar las bases de nuevos tratamientos de estimulación ovárica que permitan mejorar los resultados de las técnicas de reproducción *in vivo*. Para ello, se realizaron dos experimentos:

Un primer experimento fue realizado en un total de 18 ovejas, sometidas a un tratamiento de sincronización de celos, con el objetivo de determinar el efecto de la administración subcutánea de dos dosis únicas (1,5 y 3,0 mg) del antagonista en estudio. El análisis de los datos permitió confirmar el efecto de *teverelix* sobre los patrones de secreción de FSH y LH y los perfiles de crecimiento y funcionalidad folicular determinada por la capacidad de secreción de inhibina A. Ambas dosis indujeron una disminución significativa en el número de folículos grandes (6 mm) en los días 2 y 3 postratamiento ($0,3 \pm 0,2$ y $0,5 \pm 0,2$ ng/ml en los grupos de 1,5 y 3,0 mg, respectivamente) en comparación con

los datos del grupo control ($1,2 \pm 0,3$; $p < 0,05$). Esta disminución en el número de folículos ≥ 6 mm se relacionaba con una disminución para ambas dosis de las concentraciones medias de LH durante el periodo de estudio pasando de un valor medio de $0,63 \pm 0,22$ ng/ml para el grupo control a concentraciones de $0,55 \pm 0,13$ ($p < 0,0005$) y $0,47 \pm 0,07$ ng/ml ($p < 0,00001$) para los grupos de 1,5 mg y 3,0 mg, respectivamente. Además, en los animales tratados con teverelix no se pudo detectar ningún pulso de LH durante los periodos de 4 h estudiados a las 0, 24 y 48 h postadministración si bien en el grupo control sí se describió un patrón de pulsatilidad. Por otra parte, el tratamiento con teverelix aumentó significativamente el número de folículos de 2-3 mm sobre los datos del grupo control hasta alcanzar un máximo en el Día 2 para el grupo de 1,5 mg ($19,8 \pm 1,1$) y en el Día 4 para el grupo de 3,0 mg ($18,7 \pm 0,7$). La funcionalidad folicular, determinada en función de las concentraciones plasmáticas de inhibina A, se mantuvo hasta el final del periodo de estudio en el grupo de 1,5 mg y sólo hasta el Día 3 en el grupo de 3,0 mg; momento en el que se inició una rápida disminución de los niveles de esta hormona (desde $182,59 \pm 3,75$ a $130,02 \pm 3,12$ pg/ml). Estos resultados indicarían que la dosis de 1,5 mg de teverelix es más adecuada para ser incorporada a los protocolos de superovulación y que el momento de óptimo de administración de la misma sería 2-3 días antes del inicio de tratamiento superovulatorio con FSH.

En un segundo experimento se determinó el efecto de la administración del tratamiento indicado por los resultados previos -una dosis única de 1,5 mg del antagonista, tres días antes del tratamiento de estimulación con FSH-, sobre los perfiles de crecimiento y funcionalidad folicular durante la administración de FSH exógena, sobre la aparición del celo y pico de LH, y sobre la tasa de ovulación y el número final de embriones viables obtenidos en respuesta al tratamiento de superovulación. El estudio morfométrico de los ovarios por ultrasonografía transrectal indicó que la población folicular al inicio del tratamiento era similar a la descrita en la experiencia 1; esta población creció en respuesta a la administración de FSH en ambos grupos. El análisis de la dinámica folicular no mostró diferencias significativas entre animales tratados y control en cuanto a la aparición de nuevos folículos, pero señaló que el número medio de folículos en crecimiento fue superior en el grupo tratado ($7,1 \pm 0,8$ vs $4,9 \pm 0,6$; $p < 0,05$). Por el contrario, la media de folículos en regresión en el momento de la retirada del progestágeno fue inferior para el grupo control ($1,7 \pm 0,4$ vs $4,8 \pm 0,1$; $p = 0,05$). Los resultados en cuanto a la aparición del celo y pico de LH



no se vieron afectados de forma significativa con la administración del tratamiento con antagonistas; pero sí por la dinámica de la población folicular, con una aparición más temprana en aquellos animales con un mayor número de folículos en crecimiento. En cuanto a la respuesta superovulatoria, un 50% de los animales que presentaron pico preovulatorio de LH no llegaron a ovular; en aquellos animales que ovularon, los rendimientos fueron mayores que en el no tratado, con un número final de embriones viables superior al obtenido para los controles ($3,3 \pm 0,8$ vs $7,3 \pm 1,1$).





Summary

One of the factors that is responsible for the great variation in results obtained in superovulation techniques and embryo transfers appears to be the follicular population, referring to number and distribution per follicle size, when superovulatory treatment is commenced with FSH. The presence of large dominant follicles before ovarian stimulation is negatively related to treatment response. Therefore, the ideal ovarian situation just before commencing superovulatory treatment is a follicular population that consists of the highest possible number of follicles with an approximate size of 2-3 mm, without oestrogenic activity but with a high response capacity to pituitary gonadotropins in the absence of dominant follicles. Since dominance is only established in the presence of high levels of luteinising hormone (LH), inducing low plasma levels of this hormone prior to FSH treatment may be an effective way of improving results of superovulatory protocols. This situation can be achieved by using GnRH antagonists which act by competitive blockage, causing immediate and reversible suppression of the secretion of pituitary gonadotropins.

Based on the above points, the objective of this study was to assess the inclusion of the antagonist GnRH teverelix in a superovulation and embryo transfer protocol in order to establish guidelines for new ovarian stimulation treatments that will improve results of *in vivo* and *in vitro* reproduction techniques. To do this, two experiments were conducted:

The first experiment was conducted on a total of 18 sheep that were subjected to oestrous synchronization treatment, with the objective of determining the effect of the subcutaneous administration of two single doses (1.5 and 3.0 mg) of the antagonist under study. Data analysis confirmed the effect of teverelix on the secretion patterns of FSH and LH and growth patterns and follicular functionality determined by inhibin A secretion capacity. Both doses brought about a significant reduction in the number of large follicles (≥ 6 mm) on days 2 and 3 post-treatment (0.3 ± 0.2 and 0.5 ± 0.2 ng/ml in the 1.5 and 3.0 mg groups, respectively), in comparison with control group data (1.2 ± 0.3 ; $p < 0.05$). This reduction in the number of follicles of ≥ 6 mm was related in both dose groups to a reduction in mean LH levels during the study period, falling from a mean value of 0.63 ± 0.22 ng/ml for the control group to

levels of 0.55 ± 0.13 ($p < 0.0005$) and 0.47 ± 0.07 ng/ml ($p < 0.00001$) for the 1.5 and 3.0 mg groups, respectively. Furthermore, no LH pulse signals were detected in the ewes treated with teverelix during the 4 h periods studied at 0, 24 and 48 h post-administration, and a pulse pattern was indeed observed in the control group. In addition, teverelix treatment significantly increased the number of 2-3 mm sized follicles in comparison with control group data, attaining a maximum of 1.5 mg (19.8 ± 1.1) on Day 2 for the 1.5 mg group, and a maximum of 3.0 mg (18.7 ± 0.7) on Day 4 for the 3.0 mg group. Follicular functionality, determined by inhibin A plasma levels, was maintained until the end of the study period in the 1.5 mg group and only until Day 3 in the 3.0 mg group, when a rapid fall in inhibin A levels commenced (falling from 182.59 ± 3.75 to 130.02 ± 3.12 pg/ml). These results indicate that the 1.5 mg dose of teverelix is more appropriate for inclusion in superovulation protocols and that the optimum time for administrating the same is 2-3 days before commencing FSH superovulatory treatment.

The second experiment was to determine the effect of administrating the treatment indicated by the foregoing results -a single dose of 1.5 mg of the antagonist, three days prior to FSH stimulation treatment- on growth profiles and follicular functionality during the administration of exogenous FSH, on oestrous onset and LH peak, and on ovulation rate and the final number of viable embryos obtained in response to superovulatory treatment. The morphometric study of ovaries through transrectal ultrasonography indicated that the follicular population at the start of treatment was similar to that described in the first experiment; this population grew in response to FSH administration in both groups. The follicular dynamics analysis did not reveal any significant differences between the treated and the control sheep with regard to appearance of new follicles, but it showed that the mean number of growing follicles was higher in the treatment group (7.1 ± 0.8 vs 4.9 ± 0.6 ; $p < 0.05$). To the contrary, the mean number of atretic follicles when the progestin was withdrawn was lower in the control group (1.7 ± 0.4 vs 4.8 ± 0.1 ; $p = 0.05$). Results for oestrous onset and LH peak were not significantly affected by the administration of antagonist treatment, but the latter did affect follicular population dynamics, with an earlier appearance of a larger number of growing follicles in treated sheep. With regard to superovulatory response, 50% of sheep that presented a preovulatory LH peak did not achieve ovulation; and in the sheep that ovulated, the yield was higher than in the non-treatment group, with a higher number of viable embryos than that obtained in the control group (3.3 ± 0.8 vs 7.3 ± 1.1).





Bibliografía



Bibliografía

ABECIA, J.A.; LOZANO, J.M.; FORCADA, F.; ZARAZAGA, L. 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 209-218.

ADAMS, G.P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil.*, 54: 17-32.

ALABART, J.L.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; COGNIE, Y.; AGUILAR, B.; COCERO, M.J.; ECHEGOYEN, E.; FOLCH, J. 2001. Superovulación de ovejas Rasa Aragonesa mediante pFSH/LH y un antagonista de la GnRH (Antarelix). *ITEA*, 22 (Volumen Extra): 763-765.

ALBANO, C.; FEBERBAUM, R.E.; SMITZ, J. ET AL. 2000. Ovarian stimulation with hMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone LHRH-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Human Reprod.*, 153: 526-31.

ALBANO, C.; SMITH, J.; CAMUS, M.; RIETHMULLER-WINZEN, H.; VAN STEIRTEGHEM, A.; DEVROEY, O. 1997. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix during controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.*, 65: 917-22.

ARMSTRONG, D.T.; PAPKOFF, H. 1976. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, 99: 1144.

AVDI, M.; CHEMINEAU, P.; DRIANCOURT, M.A. 1997. Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 46: 223-235.

BAIRD, D.T. 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 343-352.

BARIL, G., VALLET, J.C. 1990. Time of ovulation in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone and out of the breeding season. *Theriogenology*, 34: 303-311.

BERLINGER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. 2004. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*, 61: 1477-1486.

BINDON, B.M.; PIPER, L.R.; CAHILL, L.P.; DRIANCOURT, M.A.; O'SHEA, T. 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25: 53-70.

BUTLER, W.R.; SMITH, R.D. 1989. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 72: 767-783.

BOUTIGNON, F.; TOUCHET, H.; MOINE, F.; MALLARDE, D.; DAVID, S.; DEGHEGHI, R. 1999. Sustained release formulation of the GnRH antagonist teverelix ; *in vivo* and *in vitro* results. *Proceedings of the Controlled Release Society*, 26: 663-664.

BREBION, P.; BELLOC, J.P.; BRIOIS, M. 1990. Elite Lacaune ewes pre-treated with a GnRH antagonist yield more usable embryos following pFSH. *Proc. 6th Meet. Assoc. Europ. Transf. Emb. (AETE)*, 12 (abstr).

BUNGARTZ, 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. Reprod. Fert.*, 101: 583-591.

CAHILL, L.P.; DRIANCOURT, M.A.; CHAMLEY, W.A.; FINDLAY, J.K. 1985. Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 75: 599-607.

CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULEON, P. 1979. Total follicular population in ewes of high and low ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 55: 27-36.

CAHILL, L.P.; MAULEON, P. 1980. Influences of season, cycle and breed on the follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 59: 321-328.

CAMPBELL, B.K.; MANN, G.E; McNEILLY, A.S.; BAIRD, D.T. 1990. The pattern of ovarian inhibin estradiol and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology*, 127: 227-235.



CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 49: 335-50.

COCCIA, M.E.; COMPARETTO, C.; BRACCO, G.L.; SCARSELLI, G. 2004. GnRH antagonists. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 115: 44-56.

COGNIE, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51: 105-16.

COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, N. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, 59: 171-188.

CONN, P.M.; CROWLEY, W.F. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine*, 45: 391-405.

COPPOCK, C.E.; NOLLER, C.H.; WOLFE, S.A. 1974. Effect of forage concentration ratio in complete feeds fed ad libitum on energy intake in relation to requirements by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 57: 1371-1386.

CUMMING, I.A.; BROWN, J.M.; BLOCKEY, M.A.; WINFIELD, C.G.; BAXTER, R.; GODING, J.R. 1971. Constancy of interval between LH release and ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 24: 134-135.

DE JONG, D.; MACKLON, N.S.; MANNAERTS, B.M.; COELING BENNIK, H.J.; FAUSER, B.C. 1998. High dose gonadotropin-releasing hormone antagonist (ganirelix) may prevent ovarian hyperstimulation syndrome caused by ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 13 (3): 573-575.

DIEDRICH, K.; DIEDRICH, C.; SANTOS, E.; ZOLL, C.; AL-HASANI, S.; REISSMANN, T.; KREBS, D.; KLINGMULLER, D. 1994. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Human Reprod.*, 9: 788-791.

DINGWALL, W.S.; McKELVEY, W.A.C.; MYLNE, M.J.A.; SIMM, G. 1994. A protocol for MOET in Suffolk ewes. 45 Ann. Meeting Europ. Assoc. Anim. Prod. S2-4 (abstr).

DRIANCOURT, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35: 55-79.

DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55: 1211-1239.

DRIANCOURT, M.A.; AVDI, M. 1993. Effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *Anima. Reprod. Sci.*, 32: 227-236.

DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C.; CAMPBELL, B.K.; McNEILLY, A.S. 1990. Granulosa cell content and production of steroids, inhibin and follicular peptides by large follicles from a range of prolific and non-prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.*, 43: 230-231.

DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C.; CLARKE, I.J.; CAHIL, L.P. 1987. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 79: 635-641.

DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. 1991. Does follicular dominance occur in ewes?. *J. Reprod. Fertil.*, 93: 63-70.

DUFOUR, J.J.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P.; MARIANA, J.C.; ROMAIN, R.F. 2000. Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 85-94.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc. Nat. Am. Soc.*, 5 (99): 2890-2894.

ERIKSON, G.F. 1978. Función ovárica normal. *Clin. Obst. Gin.*, 1: 33-55.

ERIKSON, G.F.; MAGOFFIN, D.A. 1983. The endocrine control of the follicle androgen biosynthesis. *J. Steroid. Biochem.*, 19: 113-117.

ERIKSON, G. F.; RYAN, K.J. 1976. The effect of LH/FSH, dibutiryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa all *in vitro*. *Endocrinology*, 97: 108.

FADDY, M.J.; JONES, E.C.; EDWARDS, R.G. 1976. An analytical model for ovarian follicle dynamics. *J. Exp. Zool.*, 197: 173-186.



FELBERBAUM, R; REISMANN, T; ZOLL, C; KUPLER, W; AL-HASANI, S; DIETRICH, C ET AL. 1995. GnRH antagonists in gynecology: initial results within the scope of controlled ovarian hyperstimulation. *Gynakol. Geburtshilfliche Rundsch.*, 35: 113-7

FLYNN, J.D.; DUFFY, M.P.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O. 2000. Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 285-296.

FORTUNE, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, 50: 225-232.

FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; QUIRK, S.M. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, 29: 95-109.

FRYDMAN, R.; CORNEL, C.; DE ZIEGLER, D.; TAIEB, J.; SPITZ, I.M.; BOUCHARD, P. 1992. Spontaneous luteinizing hormone surges can be reliably prevented by the timely administration of a gonadotrophin releasing hormone antagonist (Nal-Glu) during the late follicular phase. *Human Reprod.*, 7: 930-933.

GASTON-PARRY, O.; HEASMAN, K.; NEMORIN, J.K.E.; ROBINSON, T.J. 1988. A radio immunoassay for fluorogestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA and progesterone in ewes treated with FGA-impregnated intravaginal sponges. *Austr. J. Biol. Sci.*, 41: 57-67.

GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R. 1980. The effects of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 425-429.

GONZALEZ-BULNES, A.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; COCERO, M.J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; INSKEEP, E.K.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; McNEILLY, A.S.; SANTIAGO-MORENO, J.; SOUZA, C.J.H.; VEIGA-LOPEZ, A. 2004a. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Develop.*, 16: 421-435.

GONZALEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J.A.; DIAZ-DELFA, C.; GARCIA-GARCIA, R.M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO J.; COCERO, M.J.,

LOPEZ-SEBASTIAN, A. 2003a. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatments. *Small Rumin. Res.*, 48: 9-14.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; DOMINGUEZ, V.; SANTIAGO-MORENO J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. 2002a. Influence of physical ablation of dominant follicles on sheep superovulatory yields. *Reprod. Dom. Anim.*, 37: 234 (abstr).

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO J.; DOMINGUEZ, V.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. 2003b. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, 60: 281-288.

GONZALEZ-BULNES, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, R.M.; VEIGA-LOPEZ, A.; SOUZA, C.J.H.; McNEILLY, A.S. 2004b. Restoration of endocrine and ovarian function after stopping GnRH antagonist treatment in goats. *Theriogenology*. (En prensa).

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO J.; COCERO, M.J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54: 1055-1064.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO J.; COCERO, M.J.; SOUZA, C.J.H.; GROOME, N.P.; GARCIA-GARCIA, R.M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D.T. 2002b. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology*, 57: 1263-1272.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SOUZA, C.J.H.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; McNEILLY, A.S. 2004c. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology* (in press).

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO J.; GARCIA-GARCIA, R.M.; DEL CAMPO, A.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. 2001. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 65: 265-272.



GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCIA-LOPEZ, M.; GOMEZ-BRUNET, A.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. 1994. Observación del ovario en la oveja y eficacia en la detección de folículos y cuerpos lúteos mediante ecografía transrectal. *Investigación Agraria*, 9: 319-329.

GONZALEZ-BULNES, A.; SOUZA, C.J.H.; CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T. 2003c. The effect of a single long-acting injection of GnRH antagonist on ovarian follicular development in sheep. *Reproduction Abstr. Series.*, 30: 65.

GOODMAN, R.L.; KARSH, F.J. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 107: 1286-1290.

GORDON, K. 2001. Gonadotropin-releasing hormone antagonists : implications for oocyte quality and uterine receptivity. *Ann. of the New York Acad. of Sci.*, 943: 49-54.

HANSSENS, R.M.; BRUS, L.; CAHILL, D.J.; HUIRNE, J.A.; SCHOEMAKER, J.; LAMBALK, C.B. 2000. Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update*, 6: 505-518.

HENDERSON, K.M.; McNATTY, K.P.; O'KEEFE, L.E.; LUN, S.; HEAT, D. PRISK, M.D. 1987. Differences in gonadotropin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from Booroola and Merino ewes which are homozygous, heterozygous or non carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 81: 395-402.

HENDERSON, K.M.; PRISK, M.D.; HUDSON, N.; BALL, K.; McNATTY, K.P.; LUN, S.; HEATH, D.; KIEBOOM, L.E.; McMIARMID, J. 1986. Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 76: 623-635.

HERNÁNDEZ, E.R. 2000. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Human Reproduction*, 15: 1211-1216.

HILLIER, S.G.; HARLOW, C.R.; SHAW, H.J.; WIKINGS, E.J.; DIXON, A.F.; HODGES, J.K. 1988. Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries. *Hum. Reprod.*, 3: 507-511.

HISAW, F.L. 1974. Development of graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.*, 27: 95.

HOFFMAN, K.A.; WALLER, S.L.; YOUNGS, C.R. 1988. Once daily versus twice daily treatments with follicle stimulating hormone in ewes synchronized with different doses of Norgestomet. *Theriogenology*, 29: 261.

HUIRNE, J.A.F.; LAMBALK, C.B. 2001. Gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists. *Lancet*, 358: 1793-1803.

JABBOUR, H.N.; RYAN, J.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 3: 699-707.

JOHNSON, S.K.; DAILEY, R.A.; INSKEEP, E.K.; LEWIS, P.E. 1996. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 13: 69-79.

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 137-157.

KENDALL, N.R.; GONZALEZ-BULNES, A.; CAMPBELL, B.K. 2004. The use of urinary and recombinant human FSH preparations to induce superovulation in sheep and the effect on FSH and LH concentrations. *British Soc. Anim. Sci. Annual 2004 Meeting York (Reino Unido)*. 7 Abril 2004

KIESSLING, A.A.; HUGHES, W.H.; BLANKEVOORT, M.R. 1986. Superovulation and embryo transfer in the dairy goat. *J. Am Vet. Med. Assoc.*, 188: 829-832.

KISTNER, R.W. 1976. Sequential use of clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.*, 27: 72-82.

KNIGHT, P.G.; FEIST, S.A.; TANETTA, D.S.; BLEACH, E.C.L.; FOWLER, P.A.; O'BRIEN, M.; GROOME, N.P. 1998. Measurement of inhibin-A (α , β A dimer) during the oestrous cycle, after manipulation of ovarian activity and during pregnancy in ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 113: 159-166.



LERNER, S.P.; THAYNE, W.V.; BAKER, R.D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E.K.; DAIY, R.A.; LEWIS, P.A.; BUTCHER, R.L. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 176-183.

LINDELL, C.E.; MURPHY, R.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.

LINDELL, 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.

LINTERN-MOORE, S.; MOORE, G.P.M. 1979. Initiation of oocyte growth in the mouse ovary. IVth Workshop on the development and maturation of the reproductive organs and function. *Toms, Anns. Biol. Bioch. Bioph.*: 18-20.

LOPEZ SEBASTIAN, A.; COGNIE, Y.; COCERO, M.J.; DE LA FUENTE, J.; POULIN, N. 1990. Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. *Theriogenology*, 34: 175-180.

LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*, 125: 543-553.

MARIANA, J.C.; MONNIAUX, D.; DRIANCOURT, M.A.; MAULEON, P. 1991. Folliculogenesis. En "Reproduction in Domestic Animals". 4th Edn. Ed. P.T. Cupps. Academic Press, San Diego, pp: 119-171.

MARTIN, G.B.; PRICE, C.A.; THIERY, J.C.; WEBB. 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 82: 319-328.

MARTIN, G.B.; THOMAS, G.B. 1990. Roles of communication between the hypothalamus, pituitary gland and ovary in the breeding activity of ewes. In: "Reproductive physiology of Merino sheep. Concepts and Consequences". School of Agriculture. Anim Sci. University of Western Australia: Perth. Eds. C.M. Oldham, G.B. Martin, I.W. Purvis. pp. 71-84.

McNATTY, K.P.; LUN, S.; HEATH, D.A.; BALL, K.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; McDIARMID, J., GIBB, M.; HENDERSON, K.M. 1986. Differences in ovarian activity between Booroola x Merino ewes which are homozygous, heterozygous and non carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 77: 193-205.

McNATTY, K.P.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; LUN, S. 1992. Follicular development and steroidogenesis. En "Local Regulation of Ovarian Function". Eds N-O Sjöberg, L., Hamberger p.o., Jansen C., Owman y H. Il J. Coelingh. The Pathenon Publishing Group Carnforth. Lancs., UK, pp: 21-28.

McNEILLY, A.S. 1984. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 72 (1): 165-72.

McNEILLY, A.S.; FRASER, H.M. 1987. Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocrinol.*, 115: 273-282.

McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A.; FRASER, M.M. 1986. Supression of follicular development after chronic LH-RH immunoneutralization in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 76: 481-490.

McNEILLY, A.S.; SOUZA, C.J.H.; BAIRD, D.T.; SWANSTON, I.A.; McVERRY, J.; CRAWFORD, J.; CRANFIELD, M.; LINCOLN, G.A. 2000. Production of inhibin A not B in rams: changes in plasma inhibin A during testis growth and regression and expression of inhibin/activin subunit mRNA and protein in the adult testis. *Reproduction*, 123: 827-835.

MILLAR, R.P. ZHU, Y.F. CHEN, C.; STRUTHERS, RS. 2000. Progress towards the development of non-peptide orally-active gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists: therapeutic implications. *Br. Med. Bull.*, 56: 761-72.

MITCHELL, L.M.; DINGWALL, W.S.; MYLNE, M.J.; HUNTON, J.; MATTHEWS, K.; GEBBIE, F.E.; McCALLUM, G.J.; McEVOY, T.G. 2002a. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 74: 163-174.



MITCHELL, L.M.; SILVEIRA, M.; MYLNE, M.J.; MATTHEWS, K.; DINGWALL, W.S. 2002b. Seasonal differences in lamb birthweight do not arise from inherent differences in the oocyte and/or early embryo. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 207-213.

NEILL, J.D. 2002. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor subtypes. *Arch. Physiol. Biochem.*, 120: 129-136.

NÖEL, B.; BISTER, J.L.; PIERQUIN, B.; PAQUAY, R. 1994. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*, 41: 719-727.

NUTI, L.C.; MINHAS, B.S.; BAKER, W.C.; CAPEHART, J.S.; MARRACK, P. 1987. Superovulation and recovery of zygotes from Nubian and Alpine dairy goats. *Theriogenology*, 28: 481-488.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 303-313.

OLIVENNES, F.; ALVAREZ, S.; BOUCHARD, P.; FANCHIN, R.; SALATBAROUX, J.; FRYDMAN, R. 1998. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Human Reprod.*, 13: 2411-2414.

OLIVENNES, F.; AYOUBI, J.M.; FASCHIN, R.; RONGIÈRES-BERTRAND, C. ; HAMAMAH, S. ; BOUCHARD, P. ; FRYDMAN, R. 2000. GnRH antagonist in single-dose applications. *Human Reprod. Update*, 6: 313-317.

ORTMANN, O.; WEISS, J.M.; DIEDRICH, K. 2001. Embryo implantation and GnRH antagonists: ovarian actions of GnRH antagonists. *Human Reprod.*, 16: 608-611.

OUSSAID, B. ; LONERGAN, P. ; KHATIR, H.; GULER, A.; MONNIAUX, D.; TOUZE, J.L.; BECKERS, J.F.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P. 2000. Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 137-144.

PADMANABHAN, V.; McNEILLY, A.S. 2001. Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction*, 121: 21-30.

PELUSO, J.; DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.; WHITE, B.A. 1991. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17β -estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology*, 128: 191-196.

PETERS, H.; BYSRON, A.G.; FABER, M. 1973. Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse in the development and maturation of the ovary and its functions. Ed. H. Peters. *Excepta Médica*, Amsterdam. Págs: 20-23.

PICAZO, R.A.; COCERO, M.J.; BARRAGAN, M.L.; LOPEZ SEBASTIAN, A. 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*, 45: 1065-1073.

PICAZO, R.A.; LOPEZ SEBASTIAN, A. 1995. *Prod. Sanid. Anim.*, 10: 77-93.

PICTON, H.M. MCNEILLY, A.S. 1991. Evidence to support a follicle-stimulating hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Reprod. Fertil.* 93: 43-51.

PICTON, H.M.; TSONIS, C.G.; McNEILLY, A.S. 1990. The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes cronically treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.*, 127: 273-283.

REDDOCH, R.B.; PELLETIER, R.M.; BARBE, G.J.; ARMSTRONG, D.T. 1986. Lack of ovarian responsiveness to gonadotropic hormones in infantile rats sterilized with busulfan. *Endocrinology*, 119: 879-886.

REXROAD, C.E.; POWELL, A.M. 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J. Anim. Sci.*, 69: 246-251.

RICHARDS, J.S.; MIDGLEY, A.R. 1976. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod.*, 14: 82-84.



ROBINSON, T.J. 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature*, 206: 39-41.

ROBINSON, T.J. 1967. The control of the ovarian cycle in the sheep. Sydney University Press, Sydney, Australia, pp: 237-244.

ROCHE, A.; ALABART, J.L.; AGUILAR, B.; OLIVERA, J.; GONZALEZ-BULNES, A.; FOLCH, J. 2004. The presence of large follicles affects ovum pick-up efficiency in unstimulated sheep. *Reprod. Fertil. Develop.*, 16: 515.

RUBIANES, E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología*, 6: 93-103.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. 1995. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, 43: 465-472.

RYAN, K.J.; PETRO, Z.; KAISER, J. 1968. Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol.*, 328: 355.

SAMARTZI, F.; BOSCOS, C.; VAINAS, E.; TSAKALOF, P. 1995. Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 215-222.

SAUMANDE, J. 1991. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rev. Méd. Vet.*, 167: 205-218.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.M.; MARTIN, G.B.; McNATTY, K.P.; McNEILLY, A.S.; TSONIS, C.G. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fert. Dev.*, 5: 459-478.

SCARAMUZZI, R.J.; DOWNING, J.A.; CAMPBELL, B.K.; COGNIE, Y. 1988. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. *Austr J Biol Sci.*, 41: 37-45.

SCHILLO, K.K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinising hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.*, 70: 1271-1282.

SCHIRAR, A.; COGNIE, Y.; LOUAULT, F.; POULIN, N.; LEVASSERUR, M.C.; MARTINET, J. 1989. Resumption of oestrus behaviour and cyclic ovarian activity in suckling and non-suckling ewes. *J. Reprod. Fert.*, 87: 789-794.

SCHREIBER, J.R.; ROSS, G.T. 1976. Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology*, 99: 590.

SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, 49: 1133-40.

SEJRSEN, K.; NEIMANN, S. 1982. Nutritional physiology and feeding of the cow around parturition. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 20: 325-327.

SOUZA, C.J.H.; SCARAMUZZI, R.J.; DEGHENGI, R.; CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T. 2000. The effect of a single injection of a depot preparation of GnRH antagonist (Teverelix INN) on ovarian function in sheep. Joint Summer Meeting 2000. Society for the Study of Fertility. Edimburgo (Reino Unido). 31 Julio-2 Agosto 2000.

TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E.K. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.*, 74: 2985-91.

THE GANIRELIX DOSE-FINDING STUDY GROUP. 1998. A double-blind, randomised, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Human Reprod.*, 13: 3023-31.

THERIEZ, C.; DESVIGNES, A.; THIMINIER, S. 1971. Amelioration de la prolificite chez les ovins. *Bull. Tech. Inf. Minn.*, 157: 1-7.

TORRES, S.; COGNIE, Y.; COLAS, G. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*, 27: 407-419.

UILENBROEK, J. Th.J.; WOUTHERSEN, P.J.A.; VAN DER SCHOOT, P. 1980. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol. Reprod.*, 23: 219-229.



UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. 1999. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci.*, 68: 349-353.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55: 993-1004.

WEBB, R.; ENGLAND, B.G.. 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*, 110: 873-881.

WIEMER, K.E., CASSEY, P.L., McFARLAND, C.W., GODKE, R.A. (1988). Superovulatory response of split-embryo twin heifers. *Theriogenology*, 29: 328.

WISE, M.E. 1990. Gonadotropin-releasing hormone secretion during the postpartum anestrous period of the ewe. *Biol. Reprod.*, 43: 719-725.

WISE, M.E.; SAWYER, H.R.; NETT, T.M. 1986. Functional changes in luteinizing hormone secreting cells from pre and postpartum ewes. *Am. J. Physiol.*, 250: 282-287.

WOLLEN, T.S.; SCHULTZ, R.H.; NEWKIRK, H.L. 1985. Use and handling of drugs and biologicals in embryo transfer. *Theriogenology*, 23: 31-43.

YILDIZ, S.; UZUN, M.; CENESIZ, M.; UCAR, O.; KAYA, M.; ONDER, F. 2002. Effects of Sexually Activated Rams or Ewes on Pulsatile LH Secretion in Anoestrous Sheep. *Acta Vet. Brno*, 71: 297-302.

ZELEZNIK, A.J.; HILLIER, S.G. 1984. El papel de las gonadotropinas en la selección del folículo ovulatorio. *Clin. Obst. Ginecol.*, 4: 1169-1183.





Anexo



Tiempo (d)	CONCENTRACIÓN DE LH (ng/ml)		
	CONTROL	GnRH _a (1,5 mg)	GnRH _a (3,0 mg)
0	0,56 ± 0,18	0,59 ± 0,08	0,51 ± 0,16
0,5	0,50 ± 0,09	0,55 ± 0,12	0,55 ± 0,10
1	0,76 ± 0,26	0,58 ± 0,17	0,49 ± 0,12
1,5	0,60 ± 0,17	0,48 ± 0,11	0,43 ± 0,08
2	0,50 ± 0,14	0,51 ± 0,14	0,46 ± 0,13
2,5	0,52 ± 0,14	0,49 ± 0,13	0,41 ± 0,09
3	0,71 ± 0,19	0,58 ± 0,14	0,46 ± 0,11
3,5	0,57 ± 0,16	0,47 ± 0,10	0,47 ± 0,07
4	0,59 ± 0,11	0,53 ± 0,16	0,45 ± 0,12
4,5	0,58 ± 0,14	0,56 ± 0,11	0,47 ± 0,11
5	0,68 ± 0,15	0,52 ± 0,13	0,47 ± 0,11
5,5	0,70 ± 0,13	0,48 ± 0,15	0,45 ± 0,13
6	0,78 ± 0,21	0,69 ± 0,20	0,50 ± 0,13
6,5	0,77 ± 0,28	0,61 ± 0,17	0,48 ± 0,08

Tabla A.1.- Valores medios y EEM de las concentraciones de LH obtenidas a diferentes tiempos tras la administración de teverelix en las ovejas de los grupos control y tratados con 1,5 y 3,0 mg de GnRH_a.

Tiempo (d)	CONCENTRACIÓN DE FSH (ng/ml)		
	CONTROL	GnRHa (1,5 mg)	GnRHa (3,0 mg)
0	1,05 ± 0,18	0,74 ± 0,17	0,91 ± 0,16
0,5	1,28 ± 0,25	0,74 ± 0,18	1,33 ± 0,27
1	1,47 ± 0,25	0,73 ± 0,13	1,04 ± 0,20
1,5	1,09 ± 0,15	0,77 ± 0,08	0,94 ± 0,20
2	0,89 ± 0,22	0,74 ± 0,15	0,84 ± 0,16
2,5	0,89 ± 0,21	0,81 ± 0,17	0,72 ± 0,19
3	0,93 ± 0,21	0,81 ± 0,19	0,87 ± 0,17
3,5	0,86 ± 0,21	0,87 ± 0,21	0,94 ± 0,19
4	1,00 ± 0,20	0,67 ± 0,16	0,77 ± 0,19
4,5	0,92 ± 0,22	0,86 ± 0,14	0,90 ± 0,21
5	0,98 ± 0,16	0,84 ± 0,17	0,90 ± 0,21
5,5	1,00 ± 0,21	0,83 ± 0,15	0,95 ± 0,22
6	0,80 ± 0,19	0,78 ± 0,22	0,85 ± 0,15
6,5	0,94 ± 0,28	0,89 ± 0,21	0,95 ± 0,19

Tabla A.2.- Valores medios y EEM de las concentraciones de FSH obtenidas a diferentes tiempos tras la administración de teverelix en las ovejas de los grupos control y tratados con 1,5 y 3,0 mg de GnRHa.



		TIEMPO (días)							
		0	1	2	3	4	5	6	
N° DE FOLÍCULOS	CONTROL	Pequeños	5,5 ± 0,8	6,0 ± 0,4	5,8 ± 0,5	3,8 ± 0,7	5,5 ± 0,6	6,7 ± 0,5	5,0 ± 0,5
		Medianos	3,2 ± 0,5	2, ± 0,5	2,5 ± 0,5	3,2 ± 0,6	2,8 ± 0,4	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,6
		Grandes	0,5 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,3
		Total	9,2 ± 0,7	10,0 ± 0,5	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,6	9,8 ± 0,6	11,3 ± 0,5	9,3 ± 0,6
	GnRHa (1,5 mg)	Pequeños	8,2 ± 0,6	13,0 ± 0,8	19,8 ± 1,1	17,7 ± 1,1	17,2 ± 1,1	16,8 ± 0,8	14,6 ± 0,7
		Medianos	2,2 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,4	3,3 ± 0,6	4,8 ± 0,6	2,7 ± 0,4	1,0 ± 0,4
		Grandes	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,3	1,6 ± 0,4
		Total	10,7 ± 0,6	15,8 ± 0,8	22,2 ± 1,0	21,0 ± 0,9	22,8 ± 1,1	20,3 ± 0,8	17,2 ± 0,8
	GnRHa (3,0 mg)	Pequeños	7,2 ± 0,5	6,5 ± 0,8	12,0 ± 1,0	15,0 ± 0,9	18,7 ± 0,9	12,5 ± 0,7	8,2 ± 0,6
		Medianos	1,2 ± 0,3	3,0 ± 0,5	2,8 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,3 ± 0,5	2,8 ± 0,6	1,8 ± 0,3
		Grandes	1,0 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,3
		Total	9,3 ± 0,5	10,2 ± 0,7	15,5 ± 0,9	19,2 ± 0,9	23,0 ± 0,9	16,5 ± 0,7	11,4 ± 0,6

Tabla A.3.- Valores medios y EEM del número de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm), grandes (> 6 mm) y totales, obtenidos a diferentes tiempos tras la administración de teverelix en las ovejas de los grupos control y tratados con 1,5 y 3,0 mg de GnRHa.

Tiempo (d)	CONCENTRACIÓN DE INHIBINA A (pg/ml)		
	CONTROL	GnRHa (1,5 mg)	GnRHa (3,0 mg)
0	122,39 ± 2,95	235,60 ± 2,46	140,81 ± 3,82
0,5	126,39 ± 3,08	200,06 ± 2,44	151,74 ± 3,61
1	157,63 ± 2,25	181,66 ± 2,91	168,05 ± 3,43
1,5	161,42 ± 1,91	183,04 ± 2,22	164,00 ± 3,32
2	189,28 ± 2,19	169,30 ± 2,08	182,60 ± 2,98
2,5	176,67 ± 2,35	156,38 ± 1,65	165,89 ± 2,73
3	180,51 ± 2,62	164,46 ± 2,60	155,22 ± 3,01
3,5	178,84 ± 2,61	169,26 ± 2,59	138,38 ± 2,95
4	167,97 ± 2,32	171,07 ± 2,43	139,90 ± 3,34
4,5	171,34 ± 2,47	172,58 ± 3,32	130,02 ± 3,12
5	170,14 ± 2,04	167,89 ± 2,84	137,64 ± 3,69
5,5	184,39 ± 2,90	163,01 ± 2,58	140,12 ± 3,26
6	186,75 ± 2,50	158,89 ± 3,01	156,37 ± 3,38
6,5	180,99 ± 2,35	161,79 ± 3,08	139,66 ± 2,94

Tabla A.4.- Valores medios y EEM de las concentraciones de inhibina A obtenidas a diferentes tiempos tras la administración de teverelix en las ovejas de los grupos control y tratados con 1,5 y 3,0 mg de GnRHa.



		TIEMPO (h)						
		-60	-48	-36	-24	-12	0	
N° DE FOLÍCULOS	CONTROL	Pequeños	5,3 ± 0,4	7,0 ± 1,1	7,0 ± 0,9	7,0 ± 1,2	3,0 ± 0,8	1,0 ± 0,6
		Medianos	4,3 ± 0,7	5,0 ± 0,6	10,7 ± 1,2	9,7 ± 1,3	10,7 ± 0,9	8,3 ± 1,6
		Grandes	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,4	2,0 ± 0,6	4,0 ± 0,6	3,7 ± 1,0
		Total	10,3 ± 0,7	12,7 ± 1,0	18,0 ± 0,6	18,7 ± 1,1	17,7 ± 0,8	13,7 ± 1,8
	GnRHa (1,5 mg)	Pequeños	16,3 ± 1,6	12,2 ± 1,1	8,5 ± 1,3	5,8 ± 1,0	1,8 ± 0,9	1,7 ± 0,9
		Medianos	1,5 ± 0,7	4,8 ± 0,8	10,3 ± 1,3	9,7 ± 1,2	10,7 ± 1,5	9,7 ± 1,2
		Grandes	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,4	1,2 ± 0,6	3,0 ± 0,6	7,0 ± 1,1	9,7 ± 1,3
		Total	18,0 ± 1,6	17,2 ± 1,3	20,0 ± 1,1	18,5 ± 1,1	19,5 ± 1,5	21,0 ± 1,4

Tabla A.5.- Valores medios y EEM del número de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm), grandes (> 6 mm) y totales, durante el tratamiento con FSH, en las 60 h previas a la retirada del progestágeno en los animales del grupo control y del grupo tratado con 1,5 mg de teverelix.

Tiempo (h)	N° DE FOLÍCULOS					
	CONTROL			TRATADO		
	Nuevos	Crecimiento	Regresión	Nuevos	Crecimiento	Regresión
-48	6,0 ± 0,9	2,0 ± 0,0	3,3 ± 0,6	5,7 ± 0,7	4,7 ± 0,7	4,8 ± 0,6
-36	8,7 ± 0,6	4,0 ± 0,9	3,7 ± 0,7	8,2 ± 0,7	5,7 ± 0,7	5,7 ± 0,7
-24	5,3 ± 0,8	5,3 ± 0,8	5,3 ± 0,7	4,8 ± 0,7	7,3 ± 0,6	5,5 ± 0,7
-12	2,7 ± 0,6	6,3 ± 0,7	5,3 ± 0,8	5,2 ± 0,7	9,5 ± 1,0	3,3 ± 0,4
0	2,7 ± 0,7	6,3 ± 0,7	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,6	8,2 ± 0,8	4,8 ± 0,6

Tabla A.6.- Valores medios y EEM del número de folículos nuevos, en crecimiento y en regresión durante las 60 h previas a la retirada del progestágeno en los animales del grupo control y del grupo tratado con 1,5 mg de teverelix.

Tiempo (h)	DIÁMETRO FOLICULAR (mm)			
	CONTROL		TRATADO	
	F1	F2	F1	F2
-60	5,7 ± 0,6	4,7 ± 0,6	4,8 ± 0,4	3,3 ± 0,3
-48	5,3 ± 0,4	4,3 ± 0,4	5,2 ± 0,4	4,0 ± 0,3
-36	5,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4
-24	6,3 ± 0,4	5,3 ± 0,4	6,2 ± 0,3	5,2 ± 0,3
-12	6,3 ± 0,4	5,3 ± 0,4	6,3 ± 0,4	5,3 ± 0,4
0	6,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4	6,7 ± 0,3	5,7 ± 0,3

Tabla A.7.- Valores medios y EEM del diámetro de los folículos de mayor tamaño (F1) y del inmediatamente inferior (F2) durante las 60 h previas a la retirada del progestágeno en los animales del grupo control y del grupo tratado con 1,5 mg de teverelix.

Tiempo (h)	CONCENTRACIÓN DE INHIBINA A (pg/ml)	
	CONTROL	GnRH _a (1,5 mg)
-60	198,5 ± 3,4	77,8 ± 3,0
-48	294,8 ± 3,7	247,0 ± 4,9
-36	440,3 ± 7,4	687,0 ± 6,8
-24	760,8 ± 10,0	1423,6 ± 40,6
-12	1149,4 ± 12,9	2108,0 ± 10,0
0	1182,9 ± 11,6	1341,0 ± 16,2

Tabla A.8.- Valores medios y EEM de las concentraciones de Inhibina A obtenidas durante las 60 h previas a la retirada del progestágeno en los animales del grupo control y del grupo tratado con 1,5 mg de teverelix.



Tiempo (h)	HEMBRAS (%)			
	SINTOMATOLOGÍA DEL CELO		DESCARGA PREEVULATORIA LH	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
14	11,1	0	0	0
17	0	22,2	0	0
20	11,1	0	0	0
23	0	11,1	0	0
26	0	0	0	0
29	22,2	0	0	12,5
32	22,2	11,1	12,5	0
35	0	22,2	25,0	12,5
38	0	0	25,0	12,5
41	0	11,1	0	0
44	0	22,2	0	25,0
47	22,2	0	0	12,5
50	0	0	25,0	12,5
53	0	0	0	12,5
56	11,1	0	0	0
59	0	0	12,5	0

Tabla A.9.- Porcentaje de hembras que presentaron sintomatología de celo y descarga preovulatoria de LH en función del tiempo transcurrido desde la retirada del progestágeno en los grupos control y tratado con 1,5 mg de teverelix.

		T de celo (h)		T de descarga de LH (h)	
		Tiempo (h)	Rango (h)	Tiempo (h)	Rango (h)
CONTROL		34,0 ± 1,2	14-56	42,5 ± 1,4	32-59
GnRHa (1,5 mg)	TOTAL	32,0 ± 1,1	17-44	42,5 ± 1,5	29-53
	Hembras ovuladas	29,7 ± 1,5	-	36,5 ± 1,2	-
	Hembras no ovuladas	31,2 ± 1,8	-	48,5 ± 1,0	-

Tabla A.10.- Valores medios y EEM de los tiempos transcurridos desde la retirada del progestágeno hasta la presentación de la sintomatología del celo y la descarga preovulatoria de LH en los animales del grupo control y del grupo tratado con 1,5 mg de teverelix.



