

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**Departamento de Fisiología**

**INVESTIGACION DE LAS ANALOGIAS Y DIFERENCIAS ENTRE  
LA LH RECOMBINANTE Y LA hCG EN EL PROCESO REPRODUCTIVO  
FARMACOLOGICAMENTE INDUCIDO EN LA CONEJA.**

**TESIS DOCTORAL**

**José Antonio Peinado Peinado**

**Diciembre de 1993**

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La tesis titulada "Investigación de las analogías y diferencias entre la LH recombinante y la hCG en el proceso reproductivo farmacológicamente inducido en la coneja", presentada por el licenciado en Medicina D. José Antonio Peinado Peinado, ha sido realizada bajo mi dirección, y, a mi juicio, reúne las condiciones temáticas, metodológicas, analíticas y de presentación suficientes y necesarias, para ser leída y -- juzgada por el correspondiente tribunal.

CCDIRECTORA

DO. INMACULADA MOLINA BETELLA  
DNI 20 407 199

Nº Bº  
EL TUTOR (b)

Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)  
D.N.I.: \_\_\_\_\_

CCDIRECTOR

D. ALBERTO ROMEU SARRIÓ  
DNI 19494005

24-11-93

Fdo.: \_\_\_\_\_  
D.N.I.: J. A. P. PEINADO  
SIS 27551

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento, reunido en sesión ordinaria el 26 de noviembre de 1993, acordó admitir a trámite la tesis presentada por D. Jose Antonio Peinado Peinado.

Fecha reunión  
Consejo Departamento  
26 de noviembre de 1993

El Director del Departamento

  
27 - Nov - 93

Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)

**D. ALBERTO ROMEU SARRIO, Doctor en Medicina y Profesor Asociado del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia:**

**CERTIFICO:** que la tesis titulada "Investigación de las analogías y diferencias entre la LH recombinante y la hCG en el proceso reproductivo farmacológicamente inducido en la coneja", presentada por el Licenciado en Medicina D. José Antonio Peinado Peinado, ha sido realizada bajo mi dirección.

**AUTORIZO** su presentación en la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor.



**Valencia, a 3 de Enero de 1.994.**

Dña. INMACULADA MOLINA BOTELLA, Doctora en Ciencias Biológicas:

CERTIFICO: que la tesis titulada "Investigación de las analogías y diferencias entre la LH recombinante y la hCG en el proceso reproductivo farmacológicamente inducido en la coneja", presentada por el Licenciado en Medicina D. José Antonio Peinado Peinado, ha sido realizada bajo mi dirección.

AUTORIZO su presentación en la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor.

Valencia, a 3 de enero de 1994.

*J. Peinado*

## AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, y muy especialmente al Dr. Marcial Plá, por su colaboración en todo lo relativo al material animal.

A Ignacio Alvarez Cantalapiedra, Gerente del Dpto. de Bioestadística y Biometría de Laboratorios Serono, por su asesoramiento estadístico.

A María Baez, responsable del Dpto. de Documentación de Laboratorios Serono, y a Josefina Castellá, por su magnífica labor en relación a la búsqueda del soporte bibliográfico.

A Blanca Granados y la Dra. Vaticón miembros del Departamento de Fisiología de la Universidad Complutense, por su colaboración en la valoración de las muestras hormonales.

A mi empresa, Laboratorios Serono, S.A. y muy especialmente a Jacinto Fernández Lugo, Director de las Divisiones de Reproducción y Hospitalaria, por entender y compartir las inquietudes que impulsaron este trabajo de investigación.

Al Prof. Jesús A. F. Tresguerres, de cuya mano me inicié en el conocimiento de la fisiología de la reproducción, por haberme aconsejado y dirigido durante mi doctorado.

Al Dr. Alberto Romeu, pionero en España en el estudio de los efectos de la LH en reproducción experimental, por sus ideas y apoyo, y a la Dra Inmaculada Molina por brindarme su experiencia y tiempo en mi formación como investigador.

**A mis padres**

**A Sallie y Daniel**

# I N D I C E

1. JUSTIFICACION .....	2
2. HIPOTESIS DE TRABAJO .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
4. ANTECEDENTES .....	5
1. Gonadotropinas con acción luteinizante: LH y hCG .....	6
2. Inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas: el remedio farmacológico de un fenómeno fisiológico.....	20
3. Aspectos de la fisiología reproductiva de la coneja.....	31
4. Reseñas sobre la inducción de la ovulación y reproducción asistida en la coneja .....	33
5. MATERIAL Y METODOS .....	36
1. Animales utilizados. Selección .....	37
2. Hormonas utilizadas .....	38
3. Diseño general experimental .....	40
4. Inseminación artificial .....	43
5. Obtención de las muestras de sangre .....	46
6. Estudio de ovarios, ovocitos y embriones a las 48 horas de la inducción de la ovulación .....	47
7. Estudio de implantación y pérdidas precoces postimplantatorias a los 14 días de la inducción de la ovulación .....	56
8. Determinación de estradiol y progesterona .....	59
9. Análisis estadístico .....	61
6. RESULTADOS .....	65
1. Estudio descriptivo y comparativo .....	66
1.1. Estudio de los datos ováricos y embrionarios obtenidos en las hembras sacrificadas a las 72 horas .....	67
1.2. Estudio hormonal hasta las 72 horas postinducción de la ovulación .....	75

1.3. Estudio de los datos sobre implantación obtenidos hasta los 14 días .....	91
1.4. Tasa de ovulación y folículos ovulados en el total de la experiencia ....	95
2. Estudio de correlaciones .....	97
2.1. Datos ováricos y embrionarios obtenidos en las hembras sacrificadas a las 72 horas .....	98
2.2. Datos hormonales obtenidos hasta las 72 horas postinducción de la ovulación .....	106
2.3. Datos hormonales y localización de ovocitos y embriones .....	112
2.4. Datos de implantación obtenidos hasta los 14 días postinducción de la ovulación .....	114
2.5. Correlaciones de los datos obtenidos a las 72 horas con los obtenidos a los 14 días .....	118
7. DISCUSION .....	122
8. CONCLUSIONES .....	151
9. BIBLIOGRAFIA .....	153



**1. JUSTIFICACION.**

**2. HIPOTESIS DE TRABAJO.**

**3. OBJETIVOS.**

## **1. JUSTIFICACION**

**En la actualidad los modernos procedimientos, genéricamente conocidos como técnicas de reproducción asistida, constituyen la terapéutica de primera elección para el tratamiento de la esterilidad humana.**

**Entendiendo como reproducción asistida aquellas metodologías de trabajo que implican el manejo de gametos o preembriones en el laboratorio, el segundo gran capítulo del tratamiento de la esterilidad humana lo constituye la inducción de la ovulación.**

**Tanto en este último caso, como en reproducción asistida, la estimulación ovárica, seguida de la administración de hCG, parece indispensable.**

**Un porcentaje de mujeres, que podría llegar a representar aproximadamente el 25 % de todas aquéllas cuyo ovario se estimula con fines terapéuticos, muestra respuestas de tipo multifolicular y conlleva el riesgo de sufrir cuadros severos de hiperestimulación ovárica.**

**La hiperestimulación ovárica constituye un trastorno potencialmente mortal de origen endocrino con graves repercusiones hemodinámicas, claramente vinculado a la luteinización. De hecho, en la práctica clínica, es francamente excepcional en ausencia de la administración de hCG o de gestación.**

**Si bien las situaciones de hiperestimulación ovárica se desencadenan como consecuencia de la administración de hCG a dosis farmacológicas (a pacientes pretratadas con sustancias**

folículoestimulantes), éstas aparecen tardíamente. Esto ha llevado a pensar que la larga vida media de esta hormona, y su prolongada acción sobre los receptores, están implicadas en la fisiopatología de la hiperestimulación.

La reciente disponibilidad de un preparado de LH pura de origen DNA-recombinante, y el resultado de experiencias previas, justifican plenamente la realización de un protocolo de investigación.

El doctorando ha dedicado una buena parte de su actividad investigadora a la utilización de hormonas purificadas en la estimulación ovárica. En este sentido, ya en su tesina de licenciatura, analizó los efectos de la FSH "pura" sobre el ovario y el eje hipotálamo-hipófiso-ovarico en mujeres con hiperandrogenismo de origen ovárico.

## 2. HIPOTESIS DE TRABAJO

1) La administración de una dosis adecuada de LH recombinante (LH-r) a conejas pretratadas con PMSG para estimulación folicular, debe reproducir el efecto biológico (reanudación de la meiosis y ruptura folicular) de la LH natural obtenida de la orina, sin causar efectos deletéreos sobre la fecundabilidad ovocitaria ni la viabilidad de los cigotos, pues su mecanismo de acción es el fisiológico.

2) La acción de LH debe de proporcionar similares efectos biológicos, y un efecto hormonal más fisiológico que la hCG.

### **3. O B J E T I V O S**

- 1) Comprobar el efecto de una dosis de LH-r en conejas pretratadas con PMSG, sin que medie la descarga endógena de la LH consecutiva a la monta, en términos de a) tasa de ovulación y b) niveles de estradiol y progesterona.**
  
- 2) Estudiar la viabilidad de los cigotos en términos de tasa de implantación y de pérdidas precoces postimplantatorias.**
  
- 3) Comparar ambos efectos con los obtenidos con la hCG.**

## **4. ANTECEDENTES**

## **1. GONADOTROPINAS CON ACCION LUTEINIZANTE: LH Y hCG.**

### **1.1. GENERALIDADES.**

La LH pertenece a la familia de las hormonas glicoproteicas, familia a la que pertenecen otras dos hormonas hipofisarias, la FSH, la otra gonadotropina hipofisaria, y la TSH. Existe una cuarta hormona glicoproteica que es la hCG, otra gonadotropina glicoproteica junto a la LH y la FSH, que posee un origen extrahipofisario ya que se sintetiza por el corion, una vez que se produce la implantación del blastocisto.

Todas las hormonas glicoproteicas citadas poseen dos subunidades denominadas subunidad- $\alpha$  y subunidad- $\beta$ , compuestas por secuencias específicas de aminoácidos. La subunidad- $\alpha$  es común para todas las hormonas glicoproteicas mencionadas (106). Como sucede con otras hormonas proteicas, la subunidad- $\alpha$  es específica de especie (76); por su parte la subunidad- $\beta$  posee una secuencia de aminoácidos distinta en cada una de las 4 glicoproteínas. En consecuencia la subunidad- $\beta$  es específica para cada una de ellas y confiere la especificidad de la hormona en cuanto a su acción biológica (116).

A pesar de que existe la especificidad de especie descrita y de que, como muy recientemente se ha puesto de manifiesto, el receptor para las LH/CG humanas, obtenido mediante técnicas de DNA recombinante, muestra especificidad de especie en el reconocimiento del ligando (61), lo cierto es que las gonadotropinas presentan actividad cruzada entre especies (37), lo que indica que las partes esenciales de la molécula a la hora de ejercer su actividad biológica comparten características comunes entre varias especies, como es el caso de ciertas partes de la secuencia de aminoácidos de la subunidad- $\alpha$  en las especies humana y bovina,

## secuencias ricas en puentes disulfuro (157)

El peso molecular de la LH es de aproximadamente 28 KD (15), mientras que el de la hCG es de unos 38 KD (15, 116)

Una extensa revisión sobre las características estructurales y las acciones biológicas de la LH y la hCG ha sido realizada por González-Santana (42).

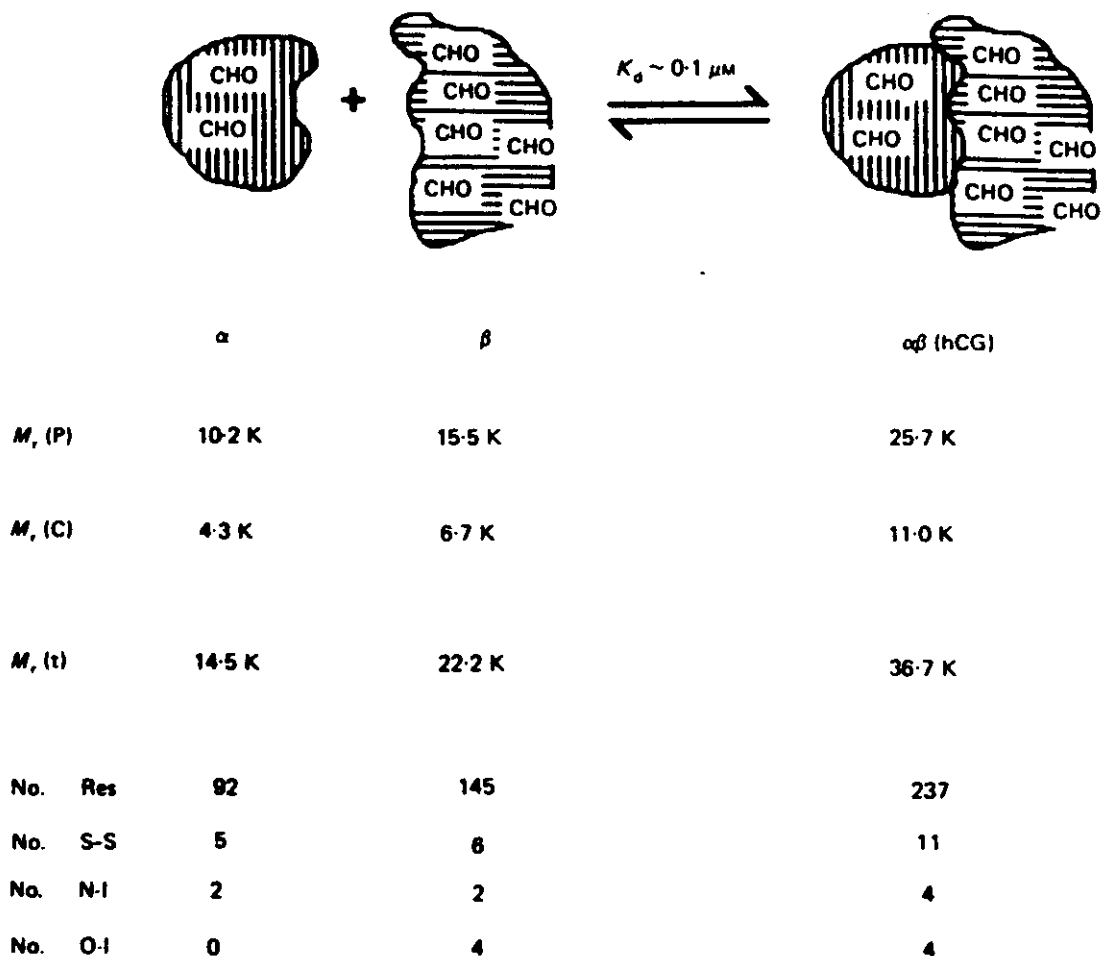


Figura 4.1. Formación reversible de la hCG a partir de las subunidades. Se detallan las características de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  como son los pesos moleculares correspondientes a las cadenas peptídicas [ $M_r$ (P)], los pesos moleculares de las cadenas de oligosacáridos [ $M_r$ (C)], peso molecular total [ $M_r$ (T)], número de residuos (No. Res), puentes disulfuro (No. S-S), número de cadenas de oligosacáridos con uniones N (No. N-I) y con uniones O (No. O-I) (Tomado de Puett, D., 116)

Para la expresión de la actividad hormonal resulta necesaria la combinación de las dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , por cuanto estas subunidades de forma aislada no poseen actividad biológica (15). Una vez que se glicosilan y se unen las subunidades la hormona adquiere su capacidad biológica. Según Catt y Dufau (15), la subunidad- $\alpha$  posee, como mínimo, dos papeles importantes. El primero es que presenta, una vez combinada con la subunidad  $\beta$ , algunos de los lugares de reconocimiento necesarios para su unión al receptor; además, como segundo papel importante, esta subunidad- $\alpha$  permite que la subunidad- $\beta$  adquiera su conformación activa una vez combinada con ella.

## 1.2. LOS OLIGOSACARIDOS EN LA ESTRUCTURA DE LA LH Y LA hCG

Una característica esencial de la LH y hCG (como de las restantes hormonas glicoproteicas) radica en las cadenas de oligosacáridos laterales ancladas en las dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , de estas hormonas (15). Las cadenas de oligosacáridos constituyen alrededor del 16 % del peso molecular de la LH, siendo esta proporción aún mayor en la hCG, y están formadas por los siguientes monosacáridos: manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, N-acetil-galactosamina y ácido siálico (131). La figura 4.2. muestra, esquemáticamente, la composición de las cadenas laterales de oligosacáridos de la LH y hCG. Esencialmente el monosacárido terminal de estas cadenas es el ácido siálico, ocasionalmente fucosa y, más raramente, galactosa (15).

El contenido de ácido siálico muestra importantes diferencias entre la LH y la hCG. Así, mientras que la LH presenta habitualmente un único residuo de ácido siálico, la hCG posee hasta 20 residuos (15). Por contra la LH es más rica en N-acetil-galactosamina como monosacárido terminal de sus cadenas laterales de oligosacáridos (106). Además, al parecer, las cadenas de oligosacáridos de la cadena alfa de la LH son más ricas en manosa que las



de la hCG (122).

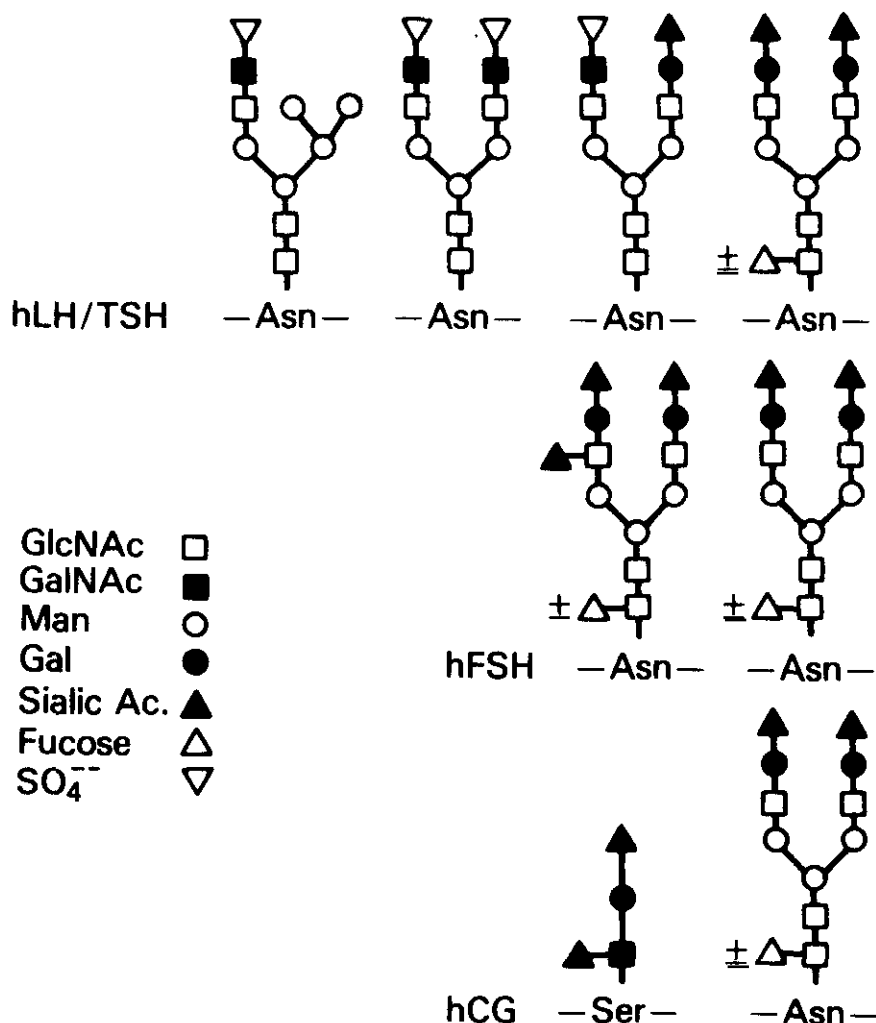
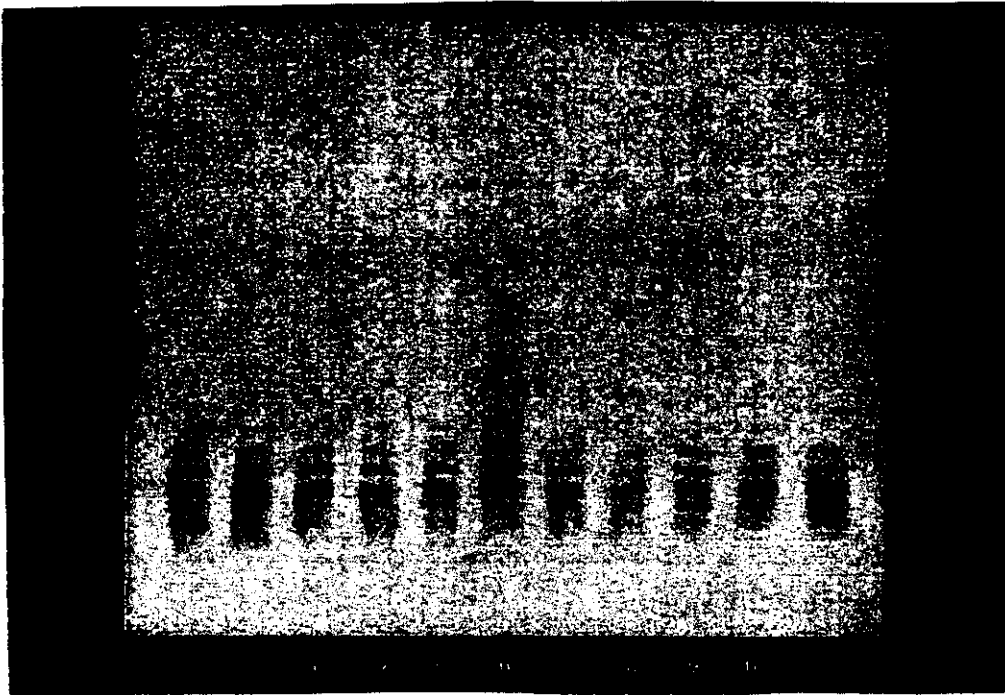


Figura 4.2. Esquema de las cadenas laterales de oligosacáridos de las glicoproteínas hipofisarias y de la hCG (Tomado de Catt y Dufau, 15).

Esta diferencia en el contenido de oligosacáridos no solo es responsable, en gran medida, de las diferencias en los pesos moleculares, que dan lugar a la existencia de toda una variedad de isoformas de cada una de estas glicoproteínas, sino que también es responsable de la heterogeneidad existente en los puntos isoeléctricos (pI) de estas gonadotropinas (158). La figura 4.3. muestra el perfil de las isoformas de una de las glicoproteínas, la FSH, obte-



**Figura 4.3.** Esta fotografía muestra algunas de las distintas isoformas que entran a formar parte de las hormonas glicoproteicas, concretamente la FSH. Se trata de un estudio mediante enfoque isoelectrico de las isoformas de FSH que componen un preparado comercial de FSH (Neo-Fertinorm<sup>®</sup>). Cada una de las columnas corresponde a un lote de esta hormona. La columna central corresponde a otro preparado de FSH

nida mediante isoelectroenfoque. En este caso las distintas bandas corresponden a un rango definido de isoformas de la FSH, comprendidas entre pI de 4,5 a 5, rango por otra parte típico de la FSH (15).

En cuanto a los pI de la LH y de la hCG entre los que se encuentran comprendidos sus rangos de isoformas, estos son de 6 a 10 para la LH y de 3 a 5 para la hCG (15)

El distinto grado de glicosilación de estas hormonas determina de forma crucial la actividad biológica de las mismas. Las isoformas con menor grado de glicosilación, por lo tanto más básicas, presentan una elevada actividad biológica in vitro, pero son eliminadas más

rápida de la circulación (158), mientras que las formas más ácidas, con mayor grado de glicosilación, presentan una menor actividad *in vitro*, pero permanecen durante mucho más tiempo en plasma, por lo que su actividad *in vivo* se prolonga más en el tiempo (158). De entre los oligosacáridos, el ácido siálico es el que juega el papel más importante a la hora de determinar la vida media de la hormona (15) y en cuanto mayor medida entra a formar parte de la composición de la isoforma, más se prolonga su tiempo de acción. La eliminación de los oligosacáridos restantes determina la abolición de la actividad biológica de la hormona, aunque no afecta al grado de unión al receptor (131).

### 1.3. LA SUBUNIDAD ALFA DE LA LH Y DE LA hCG.

Como ya se ha mencionado, en el humano, la subunidad- $\alpha$  es común para la LH y para la hCG, además de para la FSH y la TSH. Está compuesta por una cadena de 92 aminoácidos a la que se encuentran unidas unas cadenas laterales de oligosacáridos. La subunidad- $\alpha$  posee un peso molecular de 14 KD aproximadamente (15). La figura 4.4. muestra la secuencia de aminoácidos de esta subunidad, así como los lugares de unión de las cadenas laterales de oligosacáridos a la misma.

La síntesis de la subunidad- $\alpha$  se encuentra codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 6 (29) que determina una estructura genética para la hormona que permite dividirla en tres dominios, en función de los 4 exones y 3 intrones del gen que la codifica. El primer dominio ocupa desde el extremo N-terminal hasta el residuo 10; este dominio puede mostrar variaciones con cierta frecuencia (157) sugiriendo que esta fracción de la subunidad no es crítica para la acción de la hormona ni para el establecimiento de puentes disulfuro. El segundo y tercer dominio (residuos 11-71 y 72-C terminal, respectivamente) son importantes

por cuanto participan en el establecimiento de los puentes disulfuro (157) que en esta unidad

10 20 30 40  
 PRO ASP VAL GLN ASP CYS PRO GLU CYS THR LEU GLN GLU ASN PRO PHE PHE SER GLN PRO GLY ALA PRO ILE LEU GLN CYS MET GLY CYS CYS PHE SER ARG ALA TYR PRO THR PRO  
 50 60 70 80  
 ARG SER LYS LYS THR MET LEU VAL GLN LYS ASN VAL THR SER GLU SER THR CYS CYS VAL ALA LYS SER TYR ASN ARG VAL THR VAL MET GLY GLY PHE LYS VAL GLU ASN HIS THR  
 90  
 CYS HIS CYS SER THR CYS TYR TYR HIS LYS SER-COOH

Figura 4.4. Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de la LH y de la hCG (así como del resto de glicoproteínas. Los triángulos indican los lugares de anclaje de las cadenas laterales de oligosacáridos que se encuentran unidos mediante uniones N a las asparraginas correspondientes a los residuos 52 y 78 (Tomado de Catt y Dufau, 15)

son cinco y que son responsables del mantenimiento de la estructura tridimensional de la hormona (15). En estos dos dominios también se encuentran unidas las dos cadenas laterales de oligosacáridos características de esta subunidad, concretamente mediante uniones N- a los residuos asparragina 52 y 78 (15). Estas cadenas laterales específicas de la subunidad alfa se sabe que son esenciales para activar los receptores de la LH y las proteínas G unidas al sistema adenilatociclase (131) y concretamente la cadena unida a la asparragina 52 constituye el grupo de oligosacáridos más importante en la transducción de la señal (92). Muy recientemente se ha comunicado el papel esencial que, tanto para la FSH como para la LH, juegan los residuos  $\alpha$ His<sup>90</sup>-Lys<sup>91</sup> en la inducción del sistema adenilatociclase (160).

#### **1.4. LA SUBUNIDAD BETA DE LA LH Y DE LA hCG.**

La subunidad- $\beta$  de la LH y de la hCG presentan diferencias mucho más profundas que las propiamente debidas a los azúcares, que entraban en la composición de las cadenas laterales de oligosacáridos, de las subunidades- $\alpha$ . Así la subunidad- $\beta$  de la LH está compuesta por una secuencia de 121 aminoácidos, mientras que la de la hCG la forman 145 aminoácidos (15); de forma global, la BhCG y la BLH presentan una analogía de aproximadamente el 82 % de sus secuencias de aminoácidos, permitiendo los aminoácidos en exceso existentes en la BhCH, la obtención de AC monoclonales específicos (76).

Otra diferencia importante radica en que, mientras que la subunidad- $\beta$  de la LH posee una única cadena lateral de oligosacáridos N-unida a la asparragina 12, la subunidad- $\beta$  de la hCG posee en total seis cadenas laterales de oligosacáridos, de las que dos están N-unidas, una también a la asparragina 12 y la otra a la asparragina 30, siendo las 4 cadenas restantes O-unidas a los residuos 121, 127, 132 y 138, que corresponden, todos ellos, a serinas (15, 116). Estos oligosacáridos, presentes en la hCG, contienen ácido siálico como glicido terminal y no contienen  $SO_4$ , como sucede con las gonadotropinas hipofisarias, por incapacidad del tejido placentario para realizar la sulfatación debido a su carencia de sulfotransferasas (127). La figura 4.5. representa las secuencias de las subunidades BLH y BhCG y los lugares de unión de las cadenas laterales de glicidos.

El gen que codifica la subunidad- $\beta$  de la LH se encuentra en el cromosoma 19, con 3 exones y 2 intrones (29). En el caso de la BhCG se han identificado 7 genes o pseudogenes que la codifican que también contienen 3 exones y 2 intrones, estando muy relacionadas las porciones codificadoras de las dos subunidades, BhCG y BLH (29). La figura 4.6. representa las

### estructuras de los genes de la $\beta$ LH y de la $\beta$ hCG humanas.

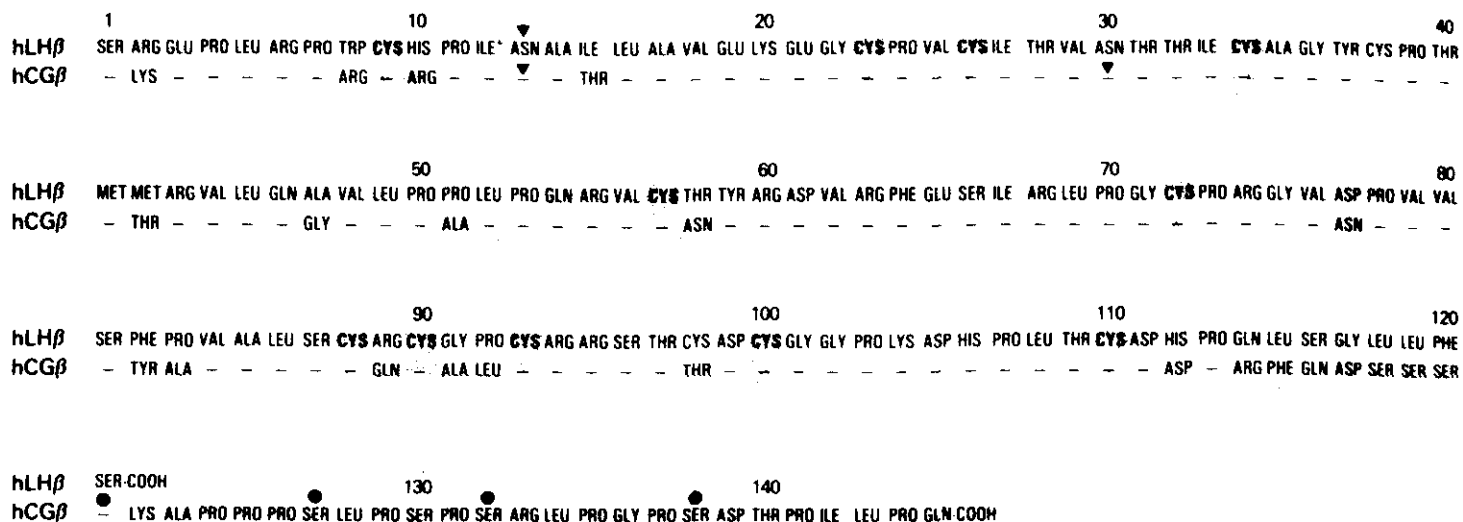


Figura 4.5. Secuencias de aminoácidos de las cadenas  $\beta$ LH y  $\beta$ hCG. Los guiones indican que el aminoácido de la cadena  $\beta$ hCG es idéntico al de la cadena  $\beta$ LH. Los triángulos indican los lugares de anclaje, mediante uniones N, de las cadenas laterales de oligosacáridos. Los círculos indican los lugares de anclaje de las cadenas laterales de oligosacáridos que se encuentran unidos mediante uniones O (15).

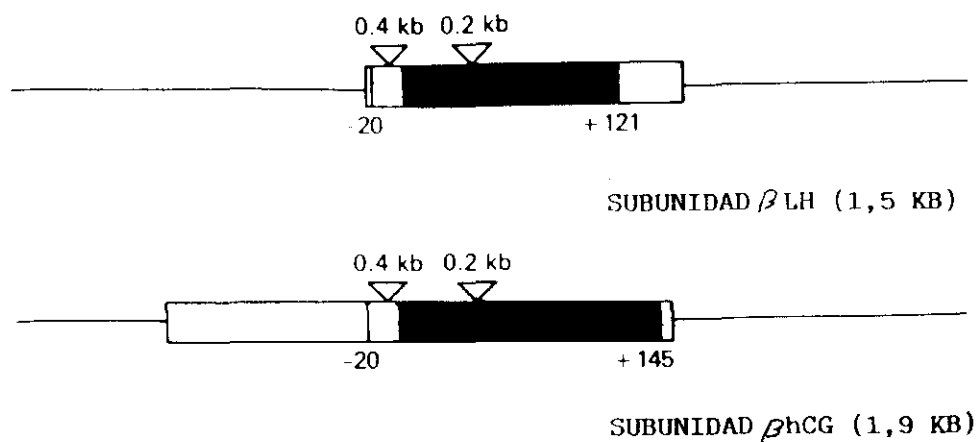


Figura 4.6. Estructura de los genes que codifican la síntesis de la  $\beta$ LH y de la  $\beta$ hCG (Segun Gharib y cols. Citado por 15)

Como consecuencia tanto del mucho mayor contenido en oligosacáridos, como del mayor número de aminoácidos, que entran a formar parte de la subunidad-βhCG, en relación a la βLH, el peso molecular es también muy superior, siendo de 14 KD para la LH, mientras que para la hCG es de unos 24 KD (127).

### **1.5. PERMANENCIA DE LA HORMONA ACTIVA.**

La vida media de la LH en plasma se ha estimado en alrededor de 60 minutos (86). En el caso de la LH recombinante la vida media bioactiva se ha determinado en 84 minutos (139), mientras que su vida media inmunoreactiva se ha estimado en 52 minutos (139). Estas vidas medias son ligeramente distintas a las de la LH extractiva hipofisaria que se han estimado en 66 y 135 minutos (inmunoreactiva y bioactiva respectivamente) y a las de la LH urinaria presente en la hMG, determinadas en 111 minutos la inmunoreactiva y 200 minutos la bioactiva (139). La diferencia en las vidas medias es consecuencia del distinto grado de sialización según su origen.

La desaparición de la LH sigue una doble curva exponencial, con un primer componente de alrededor de 20 minutos y un segundo de alrededor de 200 minutos (159), produciéndose su metabolización y eliminación a nivel del hígado y riñón respectivamente.

La vida media de la hCG es superior a las 24 horas (125, 139, 159). Yen y cols. (159) encontraron que la eliminación de la hCG seguía una curva doble exponencial, con un primer componente que presentaba una vida media de 11,2 horas por término medio (rango de 7,4 a 14,1 horas), y un segundo componente más lento con una media de 23,4 horas (rango de 21 a 27,4 horas). Posteriormente, Rizkallah y cols. (125) publicaron un estudio en el que también

se atribuía a la hCG una eliminación bifásica, de 24 a 36 horas, con un primer componente de unas 5 horas y un segundo componente de unas 24 horas. Más recientemente la vida media de la hCG, tras su administración intramuscular, se ha calculado, dependiendo del estudio, en 2,32 días, con un error estándar de 0,22 días (20), o en  $31 \pm 3$  horas (128), y tras su administración subcutánea en  $38 \pm 3$  horas (128).

Estas diferencias existentes en la vida media de la LH y de la hCG se atribuyen, básicamente, al mayor contenido en ácido siálico que presenta la hCG (15). Tsuruhara y cols. (146) estudiaron las propiedades biológicas de la hCG tras eliminar de ésta los residuos de ácido siálico. Pudieron observar que la eliminación de estos residuos no afectaba la unión de la hormona a su receptor, indicativo de que estos monosacáridos no juegan un papel importante en la función de fijación de la hormona. Sin embargo la velocidad de aclaramiento metabólico de la hormona se veía muy incrementada, siendo la vida media de la hCG desializada de tan solo 20 segundos. Además, con la desialización, se producía una cierta pérdida de la capacidad de la hCG para estimular la esteroidogénesis in vitro, que era únicamente del 46 % respecto a la molécula intacta (146). Con posterioridad se ha documentado más ampliamente este mantenimiento de la afinidad de la hCG deglicosilada por el receptor de la LH, aunque con una reducción de su actividad biológica (18, 72, 85, 66, 121, 131), debido a la disminución de su capacidad de estímulo sobre el sistema adenilatociclase que se traduce, consecuentemente, en una reducción de la esteroidogénesis (25). Esta reducción no alcanza a bloquear totalmente la esteroidogénesis in vivo (81, 108).

Junto al hecho de que la hCG posee una vida media, y una permanencia en plasma, mayor que la LH, se ha postulado que el período de fijación-activación del receptor para la hCG es mayor que para la LH (19).



La menor vida media de la LH ha hecho plantearse, a los autores de trabajos experimentales en los que se ha estudiado su efecto ovulatorio, la necesidad de administrar dosis de apoyo durante la fase lútea. Simon y cols. (139), en el único trabajo publicado sobre el uso de una LH humana recombinante para inducir la ovulación, administraron 2.000 UI de LHr para evocar un pico ovulatorio en monas hipofisectomizadas médicamente mediante la administración de un análogo antagonista de la GnRH, a las que previamente se estimuló el desarrollo folicular con FSH. Los autores administraron 50 UI de LHr cada 6 horas durante 15 días. Como consecuencia se produjo una fase lútea normal con una adecuada secreción de progesterona (139).

Zelinski-Wooten (165) comparó los efectos producidos en monas por una dosis ovulatoria de 1000 UI de hCG con los obtenidos al administrar una dosis de 2452 UI de LH urinaria seguidos o no de la administración de 200 UI de LH urinaria cada 8 horas durante la fase lútea y hasta la menstruación. La administración de LH urinaria permitió alcanzar unos valores máximos de LH bioactiva en plasma mayores o comparables a los que se alcanzan durante el pico endógeno de LH de los ciclos espontáneos, aunque con una duración inferior, de entre 18 y 24 horas. Este pico fue tres veces superior a los que se obtienen cuando se administra GnRH o un análogo de la GnRH en dosis única. El período de elevación de la LH bioactiva en plasma tuvo una duración equivalente a un tercio del que se obtuvo cuando se administró hCG que fue de 72 horas. Mientras que tanto la administración de hCG como de LH urinaria, seguida de una dosis de refuerzo de LH durante la fase lútea, produjeron una adecuada secreción de progesterona (pico de progesterona de 114 y 137 nmol/l respectivamente), la administración de una dosis ovulatoria única de LH urinaria, si bien fue capaz de producir la ovulación, maduración ovocitaria y transformación lútea del folículo, no produjo una adecuada secreción de progesterona, que alcanzó un pico de tan solo unos 20 nmol/l (165)

## 1.6. EL RECEPTOR LH/CG.

Tanto el receptor de LH presente en las células granulosas del folículo, como el receptor presente para la hCG en el cuerpo lúteo, constituyen un único tipo de receptor (76, 109, 127). Este mismo receptor, al que se ligan tanto la LH como la hCG, está presente en las células de la teca del ovario y en las células de Leydig testiculares.

La unión de estas hormonas glicoproteicas inicia toda una serie de acontecimientos comunes en el mecanismo de activación inducido por hormonas, entre los que se incluye la estimulación de la actividad adenilatociclasa por mediación de la proteína ligadora de la guanosina trifosfato, una proteína G, y la fosforilización. Por lo tanto los receptores de las hormonas glicoproteicas pertenecen a la subfamilia de receptores ligados a las proteínas G (82, 88, 94). En este grupo de receptores la transducción de la señal es asumida por el propio receptor, la proteína G y un efector, que es la adenilatociclasa. El receptor está formado por una cadena polipeptídica simple que atraviesa la membrana celular siete veces (figura 4.7.)

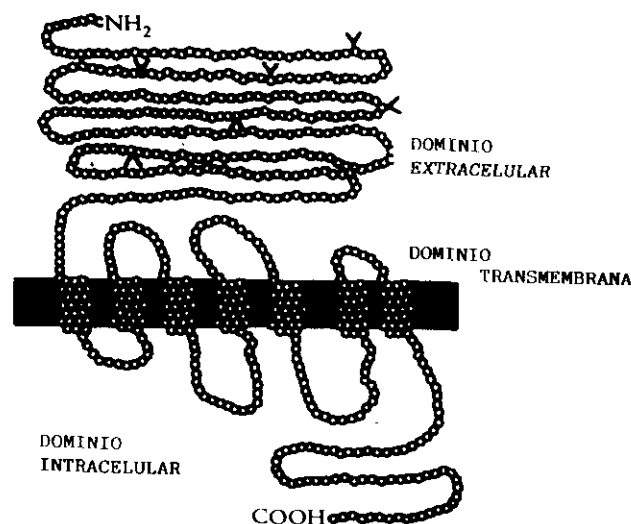


Figura 4.7. Representación de la topología de los receptores de las hormonas glicoproteicas.

La región carboxiterminal de los receptores de las hormonas glicoproteicas es muy similar a otros receptores unidos a proteínas G, incluyendo los 7 dominios transmembrana, los tres bucles extracelulares y la cola carboxiterminal citoplásmica (8). El dominio extracelular aminoterminal posee lugares N, donde potencialmente se puede producir glicosilaciones, y está compuesto por secuencias repetidas formadas por 25 residuos, entre los que abunda la leucina (88). Este dominio extracelular constituye el lugar de unión de alta afinidad de la hormona, aunque, también a los dominios transmembrana se les supone, además de un papel en la transducción de la señal, cierta acción en la unión de la hormona al receptor (8).

## **2. INDUCCION DE LA OVULACION CON GONADOTROPINAS EXOGENAS: EL REMEDO FARMACOLOGICO DE UN FENOMENO FISIOLOGICO.**

### **2.1. EL CRECIMIENTO FOLICULAR HASTA LA OVULACION EN EL CICLO OVARICO NATURAL DE LOS HUMANOS (46, 56).**

De acuerdo a A. Gougeon (46), quien ha realizado completos estudios sobre el desarrollo folicular, dicho proceso puede ser dividido en tres etapas que denomina 1) fase de inicio del desarrollo, 2) fase de crecimiento tónico y 3) fase dependiente de las gonadotropinas.

La fase de inicio del desarrollo corresponde a la evolución folicular a lo largo de 4 tipos de folículos que incluyen desde el estadio de i) folículo primordial, tipo B, en el que el ovocito está rodeado de una única capa de células granulosas planas; ii) folículo intermediario, tipo B/C, en el que el ovocito está rodeado por células granulosas planas y cuboideas; iii) folículo primario, tipo C, en el que el ovocito está rodeado de una única capa de células cuboideas; finalmente iv) folículo secundario, tipo D, en el que el ovocito está rodeado de más de una capa de células cuboideas, de acuerdo a los estudios de Lintern-Moore (79). El tiempo necesario para que los folículos completen esta fase no resulta plenamente conocido, pero se estima en aproximadamente 1-2 meses (46). La figura 4.8. muestra de forma resumida esta primera fase de la foliculogénesis.

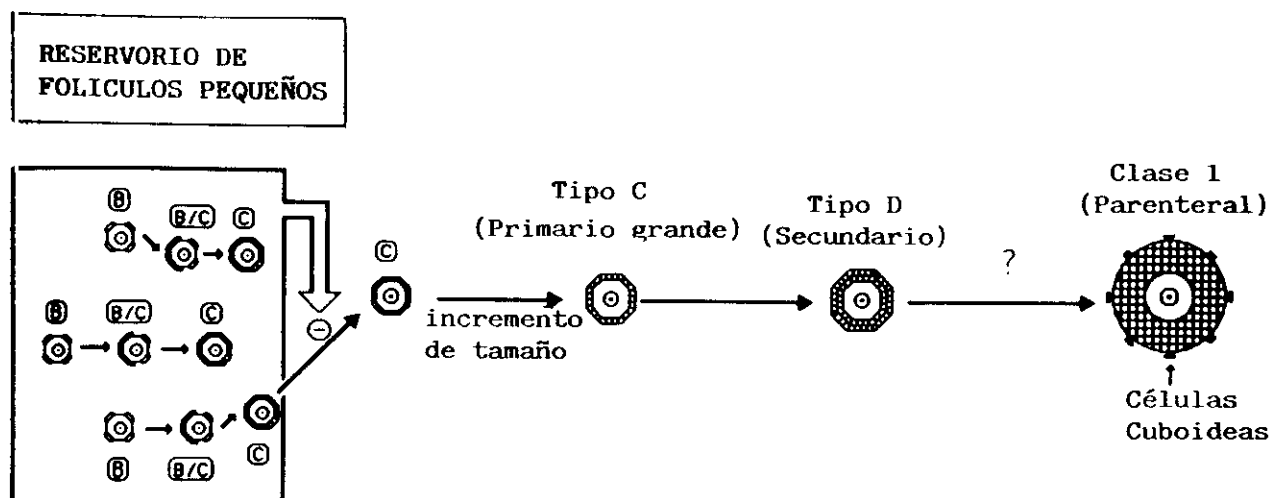


Figura 4.8. Iniciación del desarrollo folicular: el reservorio de folículos pequeños con folículos sin crecimiento, y evolución de los folículos durante las fases más tempranas de su desarrollo hasta folículo preantral de la clase 1 (tomado de Gougeon, 46).

La fase de crecimiento tónico recibe este nombre porque, durante la misma, los folículos pueden seguir creciendo, a pesar de la presencia de niveles muy bajos de gonadotropinas y el fenómeno de atresia no se relaciona con los cambios cíclicos en las gonadotropinas circulantes (46). Durante esta fase de crecimiento tónico los folículos, ya secundarios, pertenecen a 4 clases distintas, en función de su diámetro: la clase 1 la forman folículos de 0,12-0,2 mm de diámetro; la clase 2 la componen los folículos con 0,2-0,4 mm de diámetro; la clase 3 abarca a los folículos cuyos diámetros están comprendidos entre 0,4 y 0,9 mm; finalmente la clase 4 incluye folículos de 0,9 hasta 2 mm de diámetro (46) (Figura 4.9.). El proceso tiene una duración aproximada de 65 días.

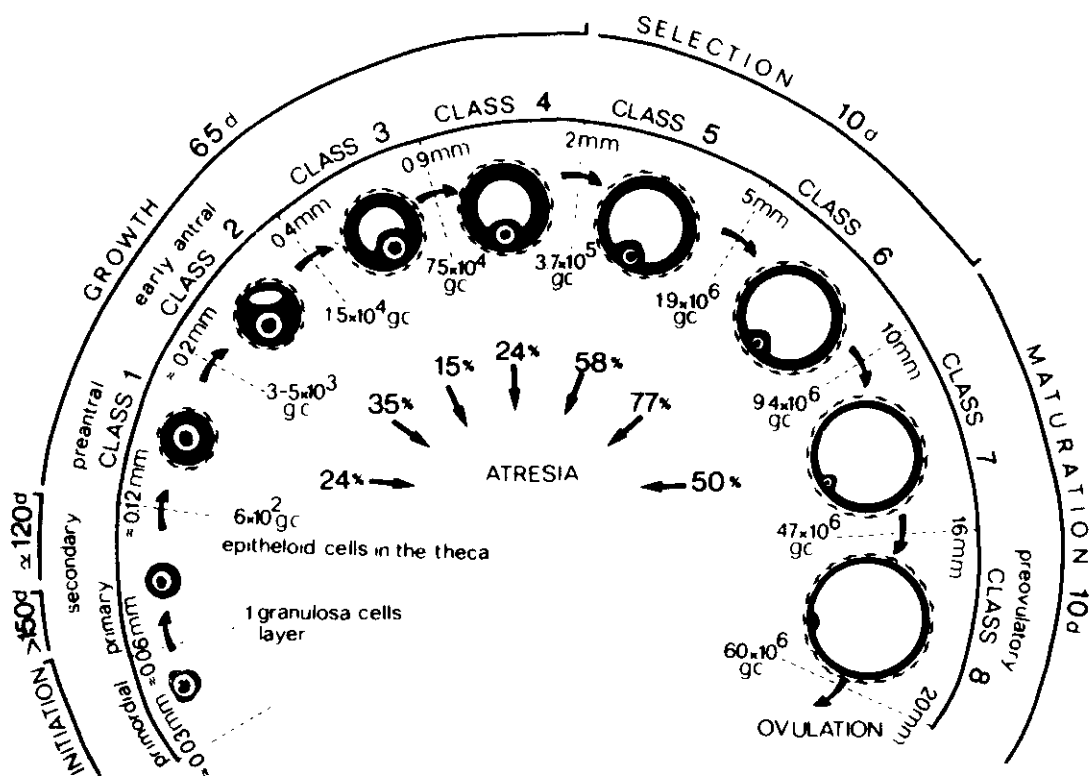


Figura 4.9. Clasificación de los folículos en el ovario humano (tomado de Gougeon, 46)

De esta forma el crecimiento tónico comienza con la entrada de los folículos en la clase 1, momento en que se produce la diferenciación de la primera capa de células de la teca interna. Dado que, para la proliferación de estas células, se necesita la presencia de estradiol y gonadotropinas a niveles suficientes (117), la entrada de los folículos en esta clase se debe producir en la fase lútea temprana de un ciclo ovárico, después de la elevación preovulatoria del estradiol y del pico ovulatorio de las gonadotropinas (46).

La entrada de un folículo en la clase 2 supone la formación de un incipiente antro y en consecuencia, un cambio cualitativo importante en el folículo. El estradiol es la hormona principal responsable de la formación del antro (120, 40). Como resultado, la elevación de los

niveles de estradiol preovulatorios del ciclo ovárico siguiente posibilitarán el paso del folículo de clase 1 a clase 2.

Unos 20 días después los folículos entran en la clase 3 (al final de la fase lútea) y unos 15 días después, durante la fase folicular tardía, en la clase 4 (46).

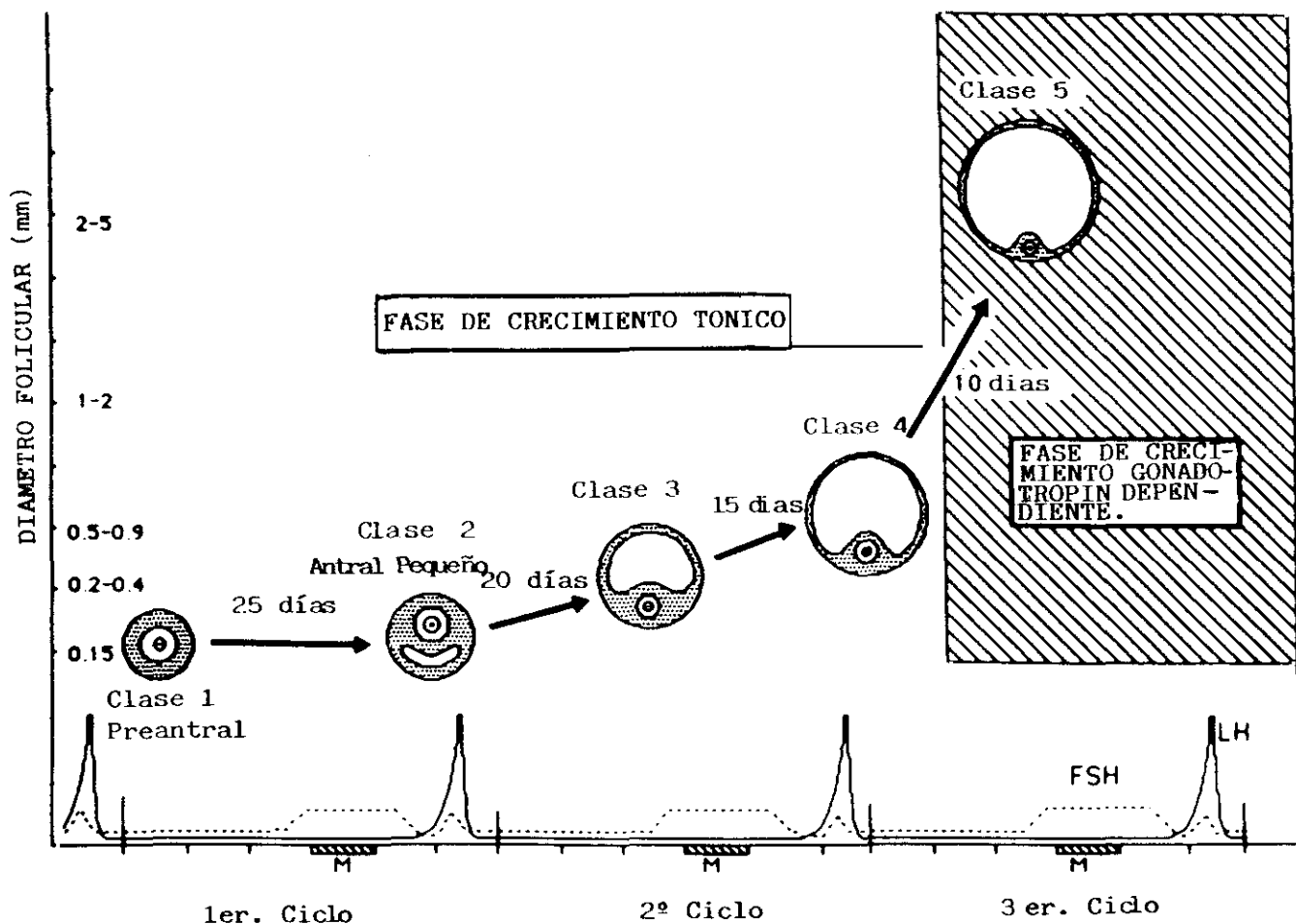


Figura 4.10. Cronología del desarrollo de los folículos correspondientes a la oleada de folículos en la que se encuentra el folículo destinado a ovular. El proceso de crecimiento tiene lugar a lo largo de tres ciclos consecutivos (Tomado de Gougeon, 46)

La fase de desarrollo folicular dependiente de las gonadotropinas se inicia con los folículos antrales pequeños (2-5 mm), de la clase 5, pasando sucesivamente por las clases siguientes hasta la clase 8, correspondiente al folículo preovulatorio, con un diámetro de 16 a 20 mm

(46). A lo largo de esta última fase los folículos aumentan en progresión geométrica tanto su contenido en células granulosas, como su actividad hormonogénica. En el ciclo natural un único folículo ovulará. Durante todo este proceso, en el que una oleada o cohorte de folículos, seguía un desarrollo paralelo, la inmensa mayoría de los folículos, en realidad todos menos el destinado a ovular, se habrán vistos abocados a la atresia en uno u otro momento (46, 56).

Los folículos antrales pequeños, a partir de 2 mm de diámetro, tienen capacidad para responder a las variaciones de FSH circulante (90) habiendo entrado, finalmente, en la etapa FSH-dependiente de su desarrollo. La elevación de FSH que se produce interciclo, y que se inicia durante la segunda semana de la fase lútea del ciclo ovárico precedente, pone en marcha el fenómeno conocido como reclutamiento (44), proceso por el que un grupo de estos folículos antrales pequeños es estimulado a desarrollarse, incrementando su índice mitótico y su capacidad hormonogénica, en respuesta al estímulo FSH (33, 44, 121). Este grupo de folículos será el responsable de proveer el que ovulará en el ciclo ovárico subsiguiente.

Sin embargo, como ya hemos expresado, en un ciclo natural solo ovulará un folículo. Este folículo es seleccionado de entre todos los folículos reclutados en base a su mejor capacitación, erigiéndose en dominante, y viéndose los restantes folículos en desarrollo abocados a la atresia (56). El proceso por el que el folículo dominante es seleccionado incluye, como mecanismo importante, la reducción en los niveles de FSH que se produce con el final de la elevación transitoria de esta hormona, que se inició en la fase lútea tardía del ciclo anterior, y que remite en los primeros días de la fase folicular. Resulta conocido que la FSH es capaz de inducir la aparición de sus propios receptores en las células granulosas (23) así como de poner en marcha toda una serie de mecanismos autocrinos y paracrinos (111). En



estas condiciones sólo el folículo mejor dotado funcionalmente es capaz de seguir adelante en su desarrollo en presencia de unos niveles menguantes de FSH. Se trata de un folículo de entre 5 y 8 mm de diámetro, cuya selección se produce hacia el día 5 ó 6 del ciclo (46) (Figura 4.11.)

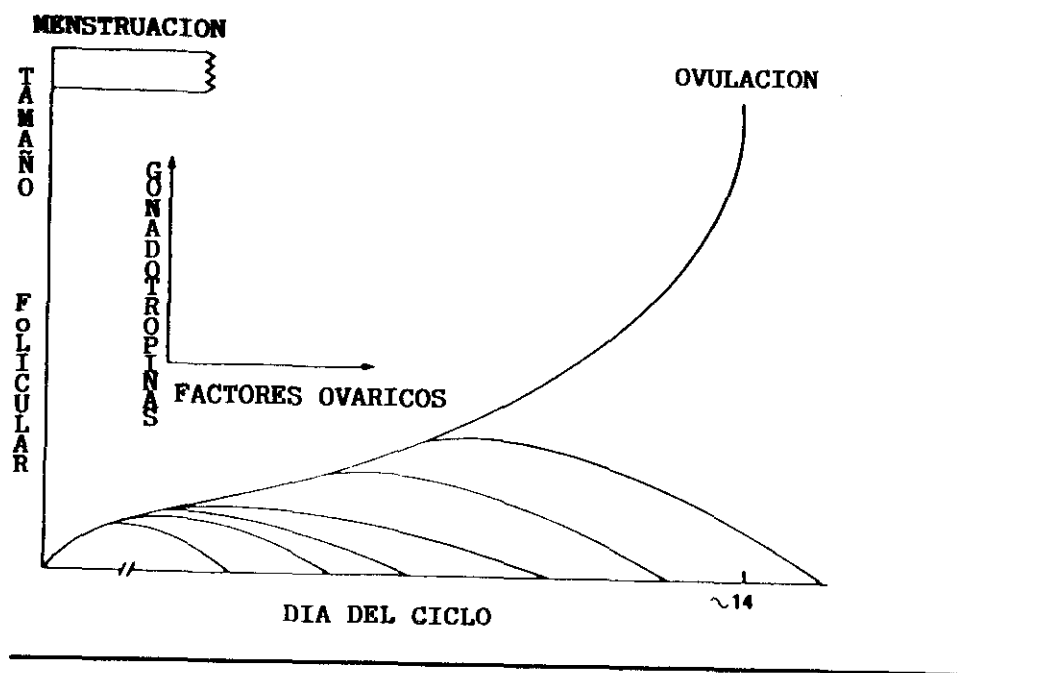


Figura 4.11. La trayectoria del crecimiento folicular durante el ciclo ovárico. Una vez seleccionado el folículo dominante a partir del grupo de folículos reclutados para ese ciclo, el resto de los mismos abandona su desarrollo y entra en atresia. Finalmente sólo el seleccionado alcanzará la ovulación (Tomado de Hodgen, 46)

Se entra así en la fase ovulatoria del ciclo ovárico, en cuya dinámica forma parte esencial la descarga ovulatoria de gonadotropinas, esencialmente LH, con un pico menor de FSH, que será responsable de la ruptura folicular, la reasunción de la meiosis por parte del ovocito y su maduración final, su extrusión del folículo, y la transformación lútea de las células granulosas. La duración media del pico de LH en el ciclo natural es de 48 horas, aunque los valores máximos se alcanzan tan pronto como a las 14 horas, momento en que sus valores

ya comienzan a declinar (59).

## **2.2. GONADOTROPINAS EXOGENAS EN LA INDUCCION DEL CICLO OVARICO.**

La administración de gonadotropinas exógenas persigue, mediante el uso de un estímulo farmacológico, generar el desarrollo folicular mediante la creación de una fase de crecimiento folicular gonadotropin-dependiente de forma artificial, bien cuando ésta no se produce de forma espontánea debido a la presencia de alteraciones endocrinas (inducción de la ovulación), o bien porque se desea ampliar el número de gametos obtenidos en un ciclo natural (superovulación), para la aplicación de una técnica de reproducción asistida.

La utilización de gonadotropinas para la inducción de la ovulación en mujeres con ciclos anovulatorios se remonta a 1945, cuando Hamblen y Davis [citado por Schwartz y Jewelewicz(137)] administraron PMSG (gonadotropina de yegua preñada) y hCG a una mujer que presentaba una hipofunción ovárica. La PMSG sin embargo fue abandonada rápidamente, en cuanto a su uso en humanos, debido a que se trata de un extracto con un elevado poder sensibilizante antigénico. En la década de los 50, Genzell y cols (38) fueron los primeros en publicar resultados positivos tras la utilización de un extracto de gonadotropinas hipofisarias humanas seguidas de la administración de hCG. La utilización de gonadotropinas de origen extractivo hipofisario se realizó durante los años siguientes a escala muy limitada debido, esencialmente, a las limitaciones propias de su origen que impedían poder disponer de las cantidades suficientes de hormona. A finales de la década de los 50 y principios de los 60, Donini y cols. (22) consiguieron purificar gonadotropinas a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas (hMG) y Lunenfeld y cols. (83) obtuvieron el primer embarazo utilizando hMG y hCG. Desde entonces el uso de gonadotropinas constituye una práctica habitual para el

tratamiento de la esterilidad por anovulación (67, 74, 75, 103, 136, 137). Además las gonadotropinas son sistemáticamente utilizadas como agentes superovuladores cuando se aplican técnicas de reproducción asistida, con el fin de incrementar el número de gametos y preembriones y aumentar, de esta forma, las posibilidades de obtener un embarazo en cada ciclo de tratamiento.

Una característica de los ciclos inducidos con gonadotropinas es la inhibición, casi sistemática, que se produce en relación al pico endógeno de LH, que debería producirse como consecuencia de la elevación de los niveles de estradiol (44, 80, 110). Por ello resulta imperativo, después de administrar el preparado gonadotrópico con acción folículoestimulante, administrar un sustituto del pico ovulatorio de LH una vez alcanzada la madurez folicular. La hormona utilizada sistemáticamente como sustituto de la LH es la hCG (35, 60, 135, 103, 137). En este mismo capítulo nos hemos detenido a estudiar las características diferenciales más notables que existen entre la LH y la hCG.

Sin embargo, cuando se utilizan las gonadotropinas para inducir la ovulación en una mujer que presenta una anovulación, el tratamiento farmacológico aportado se debe de aproximar, aunque no lo sea en sentido estricto, al concepto de terapia de sustitución. Esto es así porque la excesiva estimulación ovárica puede dar lugar a la aparición, como efecto secundario, de cuadros graves, con potencial riesgo vital, de hiperestimulación ovárica (51, 95, 100, 123, 124, 134) o embarazos múltiples, habiéndose reportado la aparición de hasta un 38 % de estos últimos en series amplias de pacientes, como la de 1897 ciclos de inducción publicada por Oelsner (103).

El tratamiento con preparados con acción folículoestimulante a dosis farmacológicas estimula,

casí sistemáticamente, el desarrollo multifolicular, como consecuencia de que el proceso de selección unifolicular, que se produce en el ciclo natural, resulta superado por el elevado nivel de FSH circulante, a causa de su administración exógena a dosis farmacológicas. En consecuencia, en el momento de la administración de la hCG, aunque tan solo resulte aparente un único folículo preovulatorio (16-20 mm), pueden existir otros folículos seleccionados que, potencialmente y si no entran en atresia, pueden continuar su desarrollo.

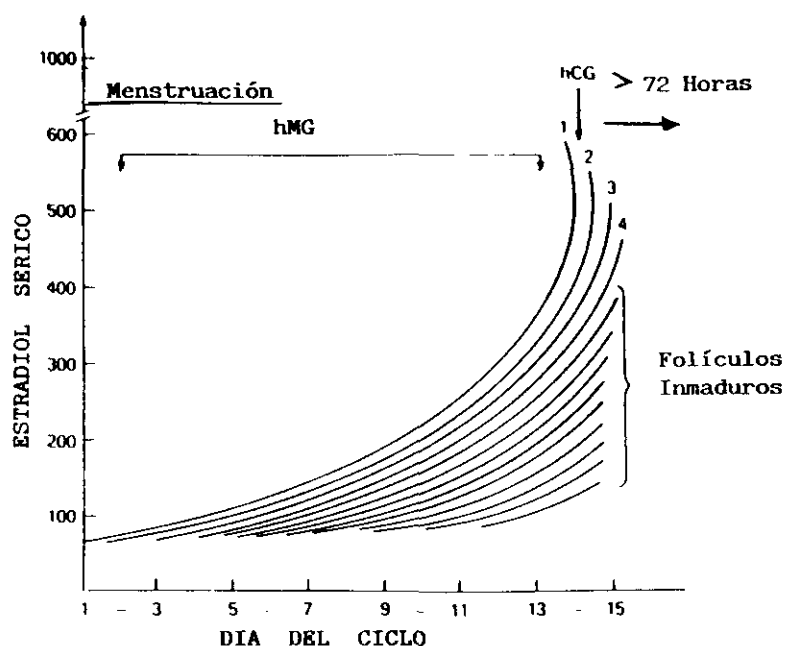


Figura 4.12. El desarrollo folicular estimulado con preparados gonadotrópicos con acción FSH (hMG ó FSH) va más allá de la selección de un único folículo dominante. Cuando se administra la hCG existen numerosos folículos en desarrollo. Como este desarrollo es asincrónico, a partir de ese momento los folículos pueden ir ovulando conforme van alcanzando el estadio de folículo preovulatorio que puede ser días después de la administración de la hCG (modificado de Hodgen, 56).

Con el fin de minimizar la presencia de más de 1 folículo preovulatorio, o el desarrollo de folículos adicionales que vayan por detrás del folículo preovulatorio, o la ovulación de un excesivo número de folículos, circunstancias todas ellas que pueden ser causa de cuadros de hiperestimulación, durante los años recientes se han desarrollado algunas estrategias activas para prevenir la hiperestimulación, a diferencia de las meramente vigilantes y de control existentes hasta ahora frente a este fenómeno.

Una de las estrategias, actualmente aceptadas de forma bastante general, consiste en actuar durante la fase folicular del ciclo estimulado, administrando dosis bajas de FSH e incrementándolas, si es necesario, de forma mínima a los 7 o 14 días, hasta encontrar un umbral de respuesta mínimo que permita el desarrollo de 1 único folículo (14, 49, 138). Esta forma de administrar la gonadotropina foliculoestimulante pretende limitar el número de folículos seleccionados de forma que, en el momento de la administración de la hCG, exista un número muy bajo de folículos activos, idealmente uno que sea el preovulatorio. Series amplias de pacientes han puesto de manifiesto que constituye una aproximación útil, que reduce el riesgo de hiperestimulaciones graves y la incidencia de embarazos múltiples (148).

Una segunda estrategia se orienta hacia la inducción misma de la ruptura folicular, ovulación, inducción de la maduración del ovocito y transformación lútea, sustituyendo la utilización de la hCG por la liberación de unos pulsos endógenos de LH hipofisaria. En 1973 Nakano y cols (99) publicaron el primer caso en que, con el fin de programar la ovulación después de la práctica de una inseminación, administraron una infusión intravenosa, durante 6 horas, de hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), logrando un embarazo en las dos mujeres en que realizaron este tratamiento. No ha sido posible encontrar más referencias en la bibliografía del uso de la GnRH nativa, un decapeptido con una vida plasmática de pocos minutos, como sustitutivo de la hCG. Más recientemente han sido numerosas las publicaciones aparecidas que hacen referencia a la utilización de los agonistas de la GnRH para inducir un pico endógeno de LH, en sustitución de la administración de hCG (28, 41, 63, 64, 77, 98, 126). Gonen y cols. (41) compararon los niveles de LH y hCG en dos grupos de mujeres que, después de haber sido sometidas a un mismo protocolo de estimulación folicular con hMG, fueron asignadas para recibir, bien una dosis de 0,5 mg de acetato de leuprolide, bien una dosis de 5.000 UI de hCG. El pico ovulatorio de LH inducido por el análogo de la GnRH

alcanzó su valor máximo a las 5 horas de su administración, llegando a unos valores en suero de 130 UI/l, descendiendo por debajo de las 10 UI/l a las 34 horas. Con la hCG el pico máximo se obtuvo a las 17 horas de su administración, alcanzando unos valores de 137 UI/l. Sus valores séricos no retornaron a niveles inferiores a las 10 UI/l hasta 5 días después de su administración. Se pudo constatar una excelente calidad de los embriones obtenidos con la LH endógena (41).

La utilización del pico endógeno de LH hipofisaria con el objetivo primario de prevenir la aparición de cuadros de hiperestimulación ovárica en ciclos de inducción de la ovulación ha sido propuesta por distintos autores (28, 64, 98, 126), con resultados favorables, probablemente debido a que la duración del periodo de actividad ovulatoria y luteinizante de la LH no se prolonga más allá de las 24 horas. Sin embargo Van der Meer (150), ha publicado un trabajo recientemente, en el que comunica la aparición de 3 cuadros de hiperestimulación moderada sobre un total de 48 ciclos de inducción de la ovulación en que se administró un análogo de la GnRH por vía nasal, para la inducción del pico endógeno de LH. El autor concluye que el uso de los análogos agonistas de la GnRH para inducir el pico ovulatorio endógeno de LH no previene la aparición de la hiperestimulación, si bien considera que la inducción de la ovulación producida por la LH endógena puede mejorar las tasas de embarazos respecto al uso de hCG.

### **3. ASPECTOS DE LA FISILOGIA REPRODUCTIVA DE LA CONEJA.**

**El aparato reproductor de la coneja está compuesto por dos ovarios, dos oviductos y dos cuernos uterinos separados entre sí que desembocan en la vagina mediante dos orificios cervicales independientes.**

**La coneja no presenta ciclo estral (6, 7, 144), produciéndose la ovulación de forma refleja cuando se produce un coito (54, 130). La gestación dura unos 30 días y si, la monta es estéril, se establece un estado de pseudogestación que dura unos 16 días.**

**El fenómeno de la ovulación en la coneja ha sido objeto de algunos estudios (101, 115), poniéndose de manifiesto que a los pocos minutos del coito se inicia la liberación de LH responsable de los cambios ovulatorios. Salvo este estímulo adicional que viene constituido por el coito, el resto de las relaciones hormonales entre gonadotropinas y esteroides es, a grandes rasgos, semejante a las observadas en las especies de mamíferos con ciclo estral.**

**En relación a los folículos preovulatorios, éstos son los que alcanzan un diámetro de 0,8 mm, mientras que los que pequeños, de 0,2 a 0,4 mm estarían destinados a la atresia (62). El número de folículos que ovulan se sitúa alrededor de los 5-6 óvulos (114).**

**La fecundación se produce a las 8 ó 9 horas después de que los espermatozoides hayan alcanzado la unión istmo-ampular en los oviductos. La emigración de los ovocitos fecundados desde el oviducto al útero se produce a partir del cuarto día, hacia las 75 u 80 horas. A las 24 horas de la fecundación se puede observar el estadio embrionario de 2 células, a las 60**

horas el de mórula y a las 72 horas el de blástula (143). Se ha documentado que los embriones en la coneja pasan a los cuernos uterinos durante la transición de mórula a blastocisto que tiene lugar hacia las 72-78 horas después del coito (10). La implantación se produce a la semana de la monta por el macho, apareciendo los botones implantatorios como pequeñas vesículas translúcidas situadas en la zona opuesta al mesometrio (1).



#### **4. RESEÑAS SOBRE LA INDUCCION DE LA OVULACION Y REPRODUCCION ASISTIDA EN LA CONEJA.**

##### **4.1. TRATAMIENTO DE ESTIMULACION OVARICA EN LA CONEJA.**

La FSH ha sido utilizada en la coneja como agente superovulador con resultados contradictorios. Si bien es cierto que se obtienen respuestas foliculares intensas, son numerosas las referencias que asocian este tipo de estimulación ovárica con la aparición de efectos negativos. Se le ha atribuido una aceleración del transporte por el oviducto (147), una posible modificación en los patrones de secreción uterina (5), ser causa de retrasos en la ovulación (70) y la producción de un mayor porcentaje de anomalías cromosómicas en los blastocistos (34). También se ha observado que, tras la administración de FSH, no se afectaba el porcentaje de ovocitos fertilizados, pero sí que se producía una elevada tasa de pérdidas preimplantatorias (5). Otros autores han observado que se producen elevadas pérdidas postransferencia y que los estudios citológicos de los embriones ponían de manifiesto la existencia de un elevado número de vesículas picnóticas (119). Los regímenes y vías de administración fueron descritos por Kennelly (70).

Dados los controvertidos antecedentes existentes con FSH, y nuestra mayor experiencia con PMSG (42, 96, 97), en el presente estudio hemos utilizado ésta última como agente superovulador. La PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) es un preparado de gonadotropinas que se extrae del suero de yeguas gestantes. La PMSG presenta una doble actividad: una actividad predominante FSH y, en menor medida, actividad LH. Su vida media

es prolongada por lo que se requiere una única administración de PMSG para obtener la superovulación.

Los estudios comparativos entre FSH y PMSG han puesto de manifiesto que el número de ovocitos degenerados en la coneja es menor con PMSG (119) y si bien es cierto que existen estudios que apoyan su utilización (118), también los hay en su contra (87). Presenta el inconveniente de su escasa relación dosis-respuesta en el conejo y su posible producción de ovulaciones prematuras.

La dosis utilizada por distintos autores ha sido variable: 25 UI (53), 50 UI (118), e incluso 100 UI (87) y las vías de administración básicas son la intramuscular (53, 118) y la subcutánea (87).

Una vez administrada la PMSG, el intervalo hasta la provocación del mecanismo ovulatorio y maduración final del ovocito mediante la administración de hCG o GnRH es de 68-72 horas (53, 87, 118); el número de cuerpos lúteos oscila habitualmente alrededor de 16-24 (87, 118).

#### **4.2. ANTECEDENTES DE INSEMINACION ARTIFICIAL EN CONEJOS.**

En 1960 Adams (1) recurrió a la práctica de la inseminación artificial en hembras de conejo, con el fin de estudiar las pérdidas pre y post-implantación. Este autor utilizó la inseminación, adicionalmente al coito natural, con el fin de incrementar las posibilidades de fecundación de los ovocitos ovulados tras la administración de hCG y el coito.

Con el fin de facilitar la recogida y posterior manipulación del semen, de forma que fuera posible la práctica de la inseminación artificial, se desarrollaron vaginas artificiales. Walton, en 1958 [citado por Adams(1)] describió un modelo perfeccionado de vagina artificial sobre el que se basan las vaginas artificiales utilizadas en la actualidad. En el apartado de material se hará una descripción detallada.

Obtenido el semen, una práctica habitual consiste en la mezcla de semen procedente de varios machos con el fin de minimizar la presencia de un posible factor masculino (1).

**5. MATERIAL**

**Y**

**METODOS**

## **1. ANIMALES UTILIZADOS. SELECCION.**

Las 40 conejas utilizadas en este trabajo pertenecen a la raza neozelandesa y se han alojado en condiciones de ambiente controlado, en la granja experimental del Departamento de *Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia*.

Los animales se han sometido a un régimen de iluminación de 16 horas diarias. Asimismo se ha controlado la temperatura que, en todo momento, trata de mantenerse con las menores variaciones posibles mediante un sistema de ventilación. Una descripción completa de las características de las instalaciones y de las características ambientales ha sido realizada por *García-Ximénez (36)*

El procedimiento de selección de los animales para el presente experimento es básicamente el descrito por *González Santana (42)*. Las hembras en lactación y los gazapos, una vez que son capaces de tomar alimento sólido, lo hacen a demanda; el resto de animales recibe 130 gr. de pienso comercial al día, cantidad suficiente para cubrir sus necesidades.

Las hembras utilizadas en este trabajo fueron separadas a las 10 semanas de edad, y exploradas convencionalmente para asegurar su bien estado de salud, con un peso mínimo de 1800 grs. A las 18 semanas y con un peso comprendido entre 3 y 4 kg, se seleccionaron definitivamente para este estudio, una vez superado un segundo examen que garantizaba su estado de salud adecuado.

## **2. HORMONAS UTILIZADAS.**

Se utilizaron tres hormonas en el presente experimento: PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), con el fin de estimular el desarrollo folicular, y hCG y LH recombinante para inducir la maduración final de ovocito y la ruptura folicular. Las características de estas sustancias se detallan a continuación.

**PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin):** se trata de un preparado gonadotrófico que se obtiene del suero de yeguas gestantes. Posee una acción esencial de tipo FSH, aunque también presenta una acción menos importante de tipo LH. Su vida media es larga y se llega a prolongar varios días. Por esta razón se realizó una única administración y a una dosis poco elevada, para evitar la variabilidad en la respuesta observada con dosis mayores e incluso el desencadenamiento de la ovulación que puede producirse. Se utilizó el preparado Serigán<sup>r</sup> (Laboratorios Ovejero, Valencia, España).

**hCG (hormona coriogonadotropa humana):** se obtiene de la orina procedente de mujeres embarazadas, durante el primer trimestre del embarazo, siendo de origen coriónico. En nuestra experiencia utilizamos Profasi 500, como liofilizado, con una bioactividad de 400-625 UI por ampolla y con lactosa como excipiente (Laboratorios Serono, Madrid, España).

**LHr (LH recombinante):** hormona luteotropa humana obtenida mediante tecnología ADN recombinante. A diferencia de la hCG que es un preparado extractivo, la LH recombinante es un preparado biosintético con una pureza superior al 99 %. La hormona fue producida y suministrada por IRCS (Intituto di Recerca Cesare Serono S.p.A., Ardea, Italia), como materia prima, en forma líquida y congelada a -20 grados C. Recibimos un volumen total de 0,5 ml.

Las características del producto se detallan a continuación. La inmunoadividad del preparado era de 44.008 UI/ml (método Serozyme) y 46,026 UI/ml (método MAIA clone). La bio-actividad determinada por el método de Van Hell fue de 113.543 UI/ml. La identificación de la sustancia se realizó mediante electroforesis (SDS-page y Western Blotting, IEF y Western Blotting) y cromatografía RP-HPLC. También se realizó un estudio de las secuencias terminales de las porciones iniciales (extremos amino) de las cadenas alfa y beta y mediante el estudio del extremo carboxiterminal de la cadena beta. El estudio de la secuencia de aminoácidos (peptide mapping) fue el correcto. El estudio de pureza se realizó mediante cromatografía de alta resolución (SEC-HPLC) que puso de manifiesto la presencia de un pico único y una pureza superior al 99 %.

Las diluciones se realizaron de acuerdo a lo siguiente: para la hCG las 50 UI se administraron en 0,2 ml de disolvente; en el caso de la LHr las 50 unidades se administraron en 0,2 ml de tampón fosfato (pH 7), solución recomendada por el fabricante y que fue la misma utilizada para la preparación de las alícuotas.

### **3. DISEÑO GENERAL EXPERIMENTAL.**

Se seleccionaron 40 conejas, de la forma ya detallada en el apartado de material animal. Estos 40 animales fueron divididos en dos grupos, de acuerdo a la hormona utilizada para inducir la ovulación y la maduración final del ovocito (LHr o hCG):

**GRUPO PMSG + LHr (n=20):** el desarrollo folicular se indujo mediante la administración de una dosis de 25 U.I. de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), una vez que la vulva de la coneja presentaba una coloración roja; a las 48 horas se procedió a la administración de 50 U.I. de LH recombinante y se practicó la inseminación tal y como se describirá más adelante.

**GRUPO PMSG + hCG (n=20):** el desarrollo folicular se indujo mediante la administración de una dosis de 25 U.I. de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), una vez que la vulva de la coneja presentaba una coloración roja; a las 48 horas se procedió a la administración de 50 U.I. de hCG y se practicó la inseminación tal y como se describirá más adelante.

De cada uno de los grupos descritos se formaron dos subgrupos compuestos por 10 hembras cada uno de ellos, 4 grupos en total, 2 que recibieron LHr y 2 que recibieron hCG, en función del momento en que fueron estudiados.

En los 10 animales del primer subgrupo LHr y en los 10 del primer subgrupo hCG, se tomaron muestras de sangre a las 0 horas (inmediatamente antes de la administración de la LHr o de la hCG), así como a las 24, 48 y 72 horas tras la inyección de la LHr o de la hCG, con el fin



de determinar los valores de estradiol y progesterona séricos y estudiar sus perfiles post-ovulatorios. Estos animales fueron sacrificados a las 72 horas de la inducción de la ovulación, con el fin de proceder al estudio ovárico y de calidad embrionaria.

En un segundo subgrupo de cada uno de los grupos (LHr o hCG) el sacrificio fue aplazado hasta los 14 días de la inducción de la ovulación, con el fin de proceder al estudio de las tasas de implantación y de las pérdidas parciales postimplantatorias.

La figura 5.1. muestra el diseño general experimental de forma esquemática.

# ESQUEMA GENERAL DE LA EXPERIENCIA

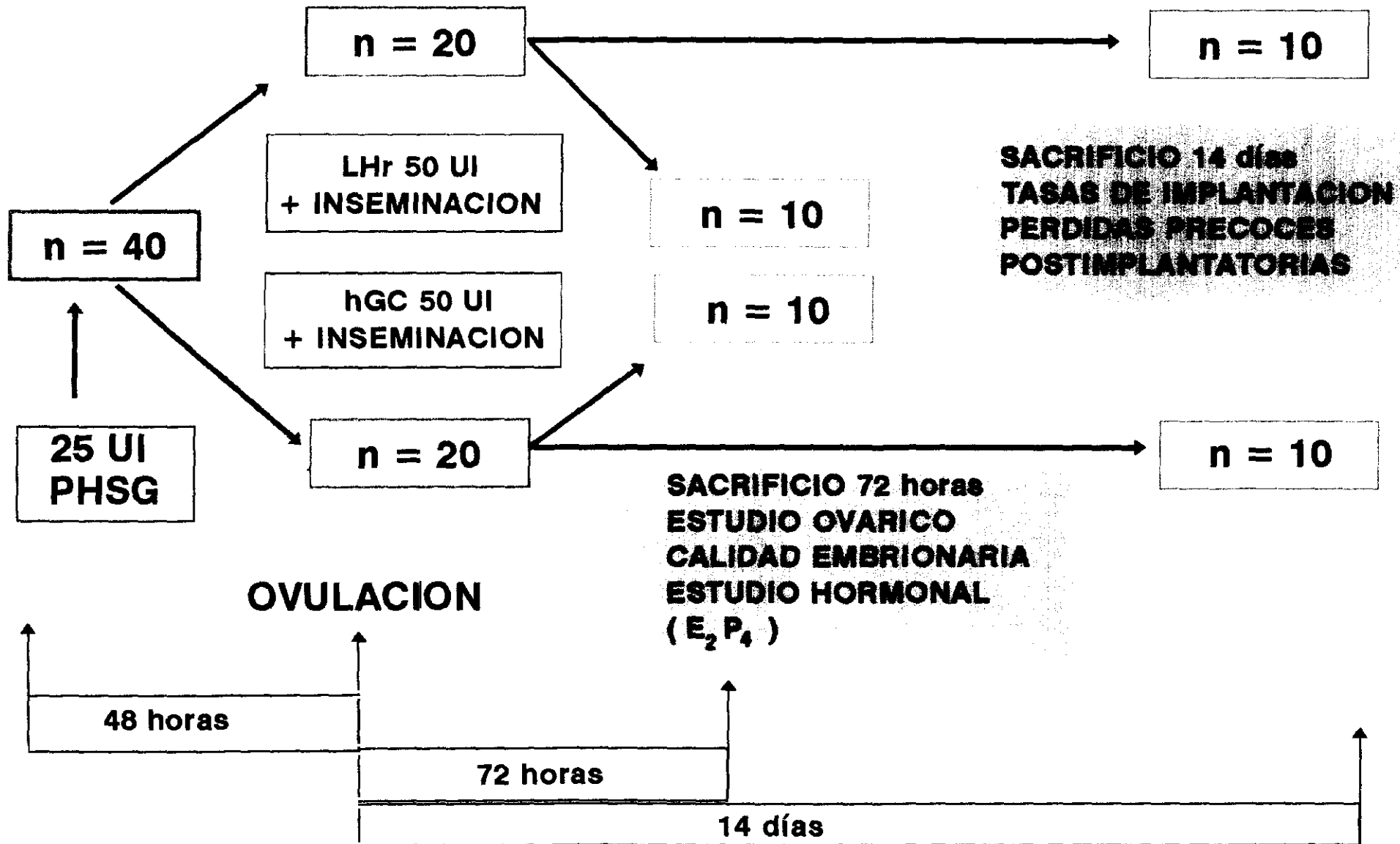


FIGURA 5.1.

## **4. INSEMINACION ARTIFICIAL**

### **4.1.RECOGIDA Y PREPARACION DEL SEMEN.**

**Para la realización de las inseminaciones se utilizó una mezcla de semen procedente de 3 a 5 machos. El semen fue obtenido mediante la utilización de una vagina artificial similar a la descrita por Boussit (11) (figura 5.2.)**

**Esta vagina artificial consta de un cuerpo formado por un cilindro de plástico de 2,8 cms de diámetro interior y 3,7 cms de diámetro exterior y 9,5 cms de longitud. Va provista de una válvula que permite la introducción de agua caliente en la misma. Al cuerpo se le adapta una funda o camisa. En nuestra experiencia utilizamos un preservativo, al que se le había cortado previamente el extremo distal, como camisa. Esta camisa se introdujo en el interior de la vagina artificial volviéndose los extremos de la misma, permitiéndose de esta forma la creación de una cámara entre el cuerpo y la funda o camisa para la introducción de agua. Un manguito de caucho de sección decreciente permitió la recolección del semen depositado en la vagina, que era así recogido en un tubo de vidrio de 10 cc de capacidad.**

**Una vez calentada el agua, ésta se introducía a unos 40 grados de temperatura en el espacio creado entre la funda y el cuerpo de la vagina artificial a través de la válvula. Esta temperatura es la más adecuada para obtener la eyaculación del animal en el interior de la vagina artificial.**

**Previamente a la introducción del pene del macho utilizamos un lubricante en el extremo**

abierto de la vagina artificial. Para la introducción del pene en la vagina artificial se recurrió a la utilización de una hembra viva como maniquí.

Los tubos utilizados para la recolección del semen se almacenaron en un contenedor a 37 grados centígrados.

El semen así recogido fue estudiado en relación a la concentración y motilidad de los espermatozoides y una vez controlada su calidad, incubado al baño maría hasta su dilución en leche descremada a la razón de 3 cc de semen en 8 cc de leche descremada. La concentración de espermatozoides por cc de esta dilución es de alrededor de 150.000 por cc.

De este semen preparado se utilizó 1 cc para la inseminación de cada una de las hembras incluidas en el estudio.

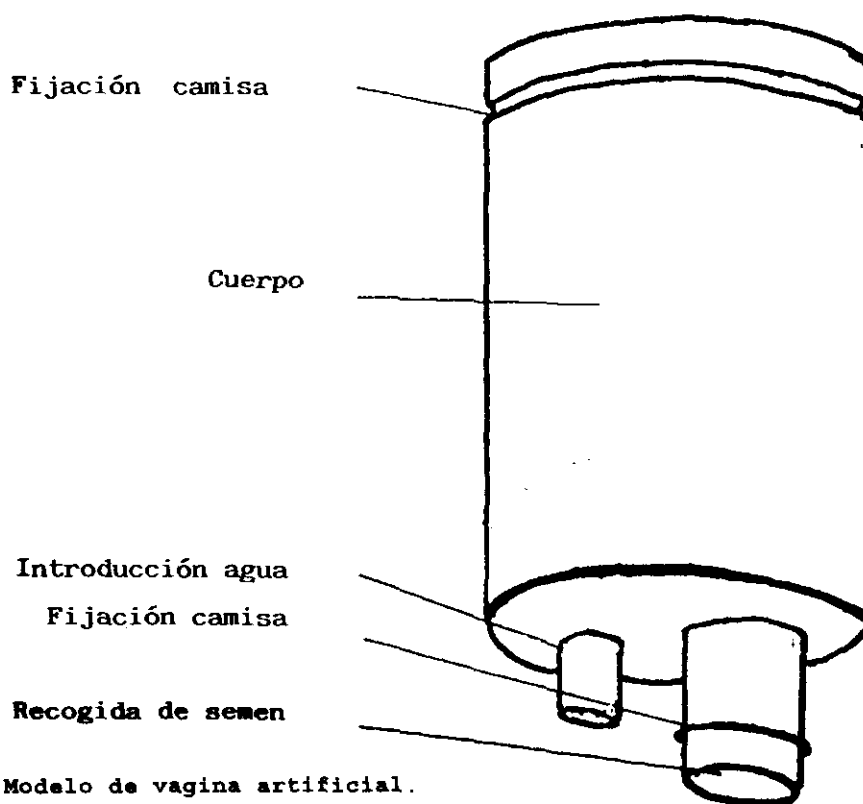


Figura 5.2. Modelo de vagina artificial.

#### **4.2.INSEMINACION.**

**En nuestra experiencia utilizamos una técnica de inseminación artificial de la coneja similar a la descrita por Egea y cols (26) con algunas variaciones. Para la realización de la inseminación se utilizó una pipeta de vidrio estéril para inseminación de 23 cms de longitud y 7 mm de diámetro externo. Esta pipeta posee una acodadura de 150 grados en el tercio distal, que es el que se introduce en la vagina de la coneja, con el fin de facilitar su correcta penetración. El otro extremo de la pipeta se conectó a una jeringa mediante un tubo de goma. Antes de proceder a la carga del semen en la jeringa se aspiró una cantidad de aire y posteriormente, el propio semen. Ello permite que todo el semen pueda ser introducido en la vagina de la coneja y no quede atrapada en el sistema ninguna cantidad residual.**

**Una vez sujeta la hembra se procede a introducir la pipeta, con la acodadura hacia la parte dorsal y una vez pasada la pelvis se le da un giro de 180 grados hasta alcanzar una longitud de 8-14 cm, momento en que se habrá alcanzado el cérvix. En ese momento se introduce el semen presionando la jeringa, retirándose lentamente la pipeta.**

**Realizada la inseminación se procedió a la inyección de hCG o de LH recombinante con el fin de inducir la ovulación.**

## **5. OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PARA LAS DETERMINACIONES DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA.**

**Se tomaron muestras de sangre de las diez conejas de cada subgrupo (LHr y hCG) sacrificadas a las 72 horas.**

**Se practicaron 4 tomas de sangre en cada una de las conejas: momento 0, inmediatamente antes de la administración de la LHr o de la hCG y posteriormente a las 24, 48 y 72 horas post-inducción de la ovulación y de la maduración final del ovocito.**

**Las tomas de sangre se realizaron mediante la canulación de la arteria central de la oreja. Para obtener una vasodilatación se procedió a tratamiento previo con xilol. Utilizamos un sistema Vacutainer<sup>®</sup>.**

## **6. ESTUDIO DE OVARIOS, OVOCITOS Y EMBRIONES A LAS 72 HORAS DE LA INDUCCION DE LA OVULACION.**

**En los ovarios se procedió a estudiar los siguientes parámetros a las 72 horas de la inducción de la ovulación y la maduración final de ovocito:**

- Número de cuerpos lúteos (CL).**
- Número de folículos preovulatorios (FP).**
- Número de folículos hemorrágicos (FH).**
- Potencial ovulatorio, tomado como la suma del número de folículos preovulatorios y el número de cuerpos lúteos (Pot).**

**De la misma forma, en los oviductos se procedió a estudiar:**

- Número de blastocistos en oviductos.**
- Número de ovocitos en oviductos.**

**En los cuernos uterinos se procedió a estudiar:**

- Número de blastocistos en cuernos uterinos.**
- Número de ovocitos en cuernos uterinos.**

**En relación a los embriones obtenidos se procedió a determinar:**

- El número total de blastocistos.**

-La tasa de fecundación.

-La calidad embrionaria.

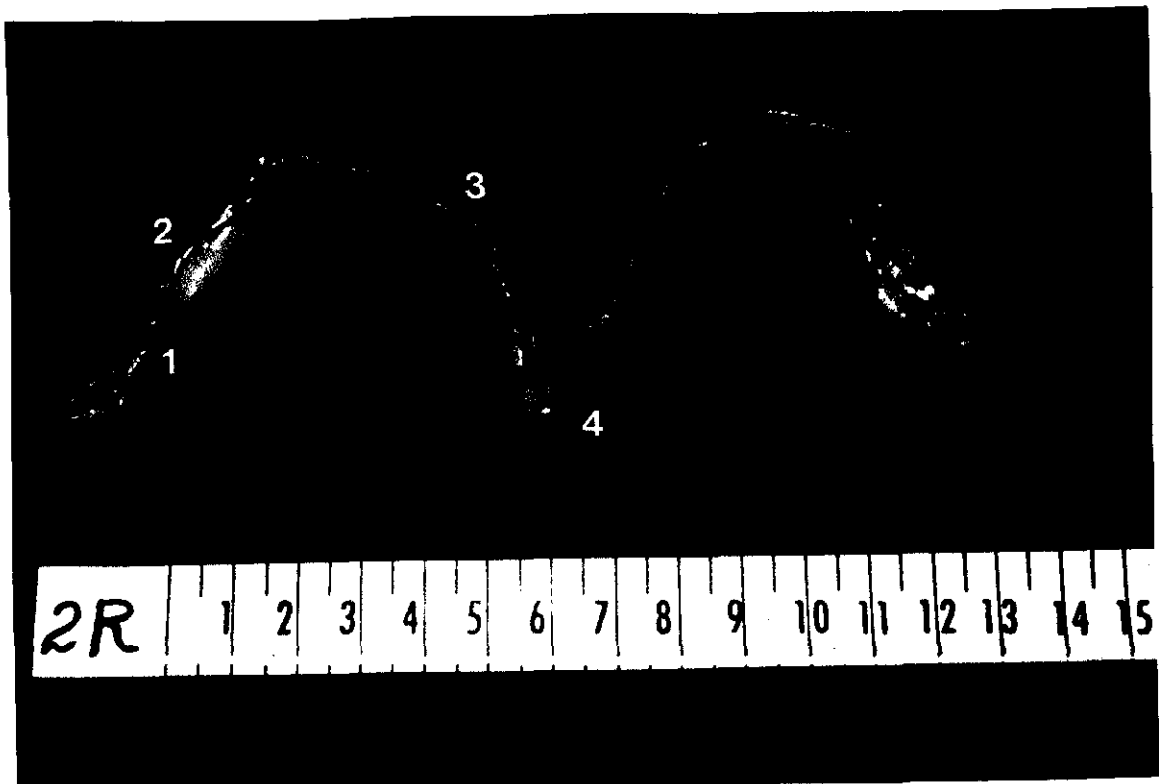
## **6.1. ESTUDIO DE LOS OVARIOS.**

Las hembras fueron sacrificadas mediante la sección de la vena yugular y la arteria carótida. Una vez sacrificado el animal se procede a la evisceración separándose el aparato genital del mismo (Fotografía 5.1.). Posteriormente se separan los ovarios y se procede al estudio de las estructuras foliculares presentes. Para ello procedimos a la observación de las mismas mediante el uso de una lupa binocular de 12,5 aumentos, realizándose el conteo de:

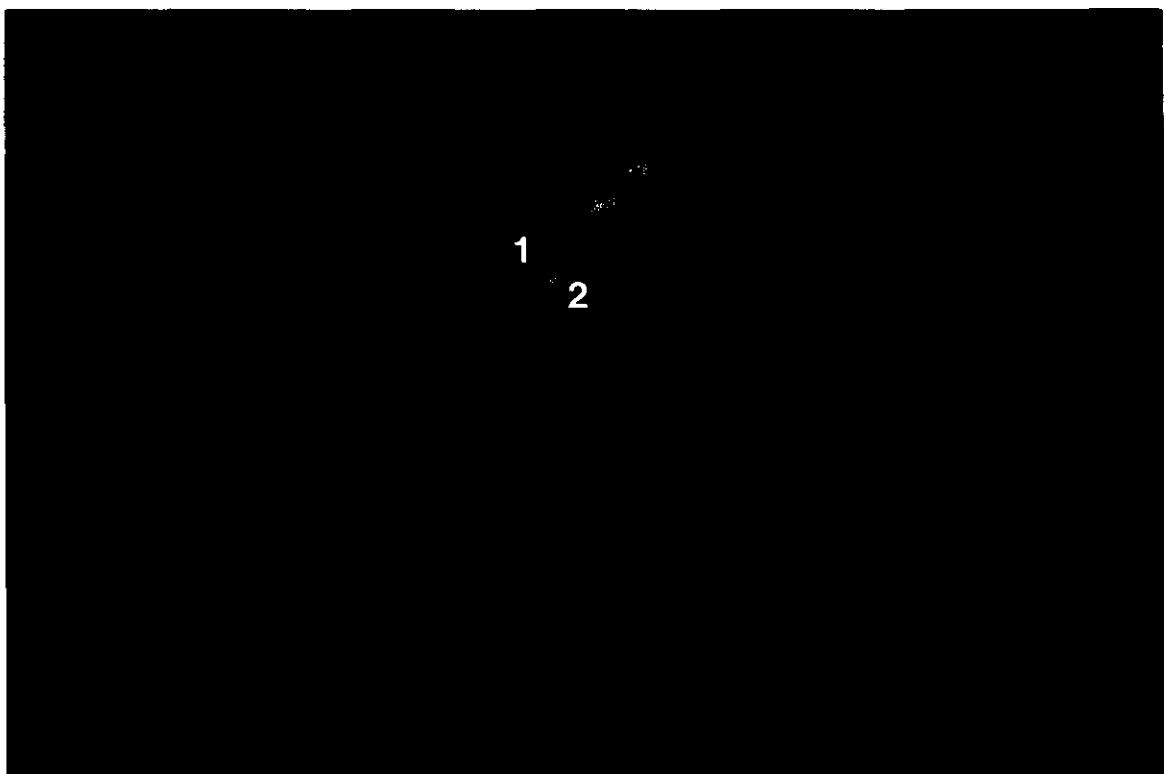
-**FOLICULOS LUTEINIZADOS; CUERPOS LUTEOS (CL).** Se trata de folículos grandes que poseen un diámetro de aproximadamente 1 mm y que presentan una cicatriz ovulatoria fácilmente visualizable; son opacos y de color amarillo, por lo que resaltan notablemente sobre la superficie del ovario. Se procedió al conteo de los mismos en los dos ovarios de cada coneja (fotografía 5.2.).

-**FOLICULOS HEMORRAGICOS (FH).** Son folículos de un tamaño inferior a los luteinizados (0,7 mm de diámetro aproximado). Como consecuencia de que no han ovulado, y a diferencia de los cuerpos lúteos, no presentan cicatriz ovulatoria y poseen una cubierta lisa y transparente que permite visualizar el contenido hemorrágico que hay en su interior. Se trata de folículos que han sufrido una lisis vascular consecuencia de una cierta transformación debido a la acción luteotropa de la hCG o de la LH. Sin embargo el proceso ovulatorio no se ha completado, probablemente debido a una acción luteinizante insuficiente por un escaso desarrollo de los receptores a LH. Igualmente se procedió al contaje de los mismos en cada uno de los ovarios





Fotografía 5.1. Tracto reproductor de la hembra de conejo. Permite visualizar ambos ovarios (1), oviductos (2) y cuernos uterinos (3), así como el cérvix (4).



Fotografía 5.2. Ovario de coneja en la que son visibles las siguientes estructuras: 1. Cuerpo lúteo; 2. folículo preovulatorio.

de las hembras estudiadas (fotografía 5.3.).

**FOLICULOS PREOVULATORIOS (FP).** Son folículos de menor tamaño que los anteriores (0,5 a 0,7 mm de diámetro). Tampoco presentan cicatriz ovulatoria y su cubierta transparente permite ver el contenido translúcido de los mismos. Estos folículos han sufrido todo el proceso de desarrollo folicular a consecuencia del efecto foliculoestimulante de la PMSG pero, sin embargo, no han respondido en absoluto al efecto luteotropo de la LH o de la hCG manifestando algún tipo de transformación lútea, probablemente a consecuencia de una carencia casi total de receptores para la LH. Se procedió al contaje de estas estructuras en cada coneja (fotografías 5.2. y 5.3.).

**POTENCIAL OVULATORIO (Pot=CL+FP).** Se trata de una expresión numérica que, en el presente estudio, será el resultado de la suma del número de cuerpos lúteos y el de folículos preovulatorios. Se calculó en cada uno de los animales estudiados.

## **6.2. ESTUDIO DE LOS OVOCITOS Y EMBRIONES PRESENTES EN OVIDUCTOS.**

Para el estudio de los oviductos se procedió a seccionar a nivel de la ampúla y de la unión istmo-uterina. Los oviductos fueron perfundidos con 10 cc de medio Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) con el propósito de obtener los blastocistos y los ovocitos presentes en los mismos.

Para la perfusión de los dos oviductos utilizamos una jeringa de 5 cc conectada a un catéter de poliuretano. El volumen de DPBS idóneo es de 10 ml. El catéter utilizado para la perfusión de los oviductos fue introducido en el infundíbulo. La técnica utilizada para recoger los

embriones y ovocitos ha sido descrita previamente por Vicente (155), realizándose la perfusión en una copa cónica invertida y abierta por ambos extremos, recogiendo los embriones en un tubo estéril.

Posteriormente se procedió al conteo de los ovocitos (NOO) y de los blastocistos presentes en los oviductos (NBO) y a la evaluación morfológica de estos últimos. Para ello se utilizó un microscopio de contraste de fases de la casa Nikon modelo Diafot, utilizando una magnificación de 40 x 10 aumentos. Se tomaron fotografías de los blastocistos mediante el uso de una cámara acoplada al microscopio.

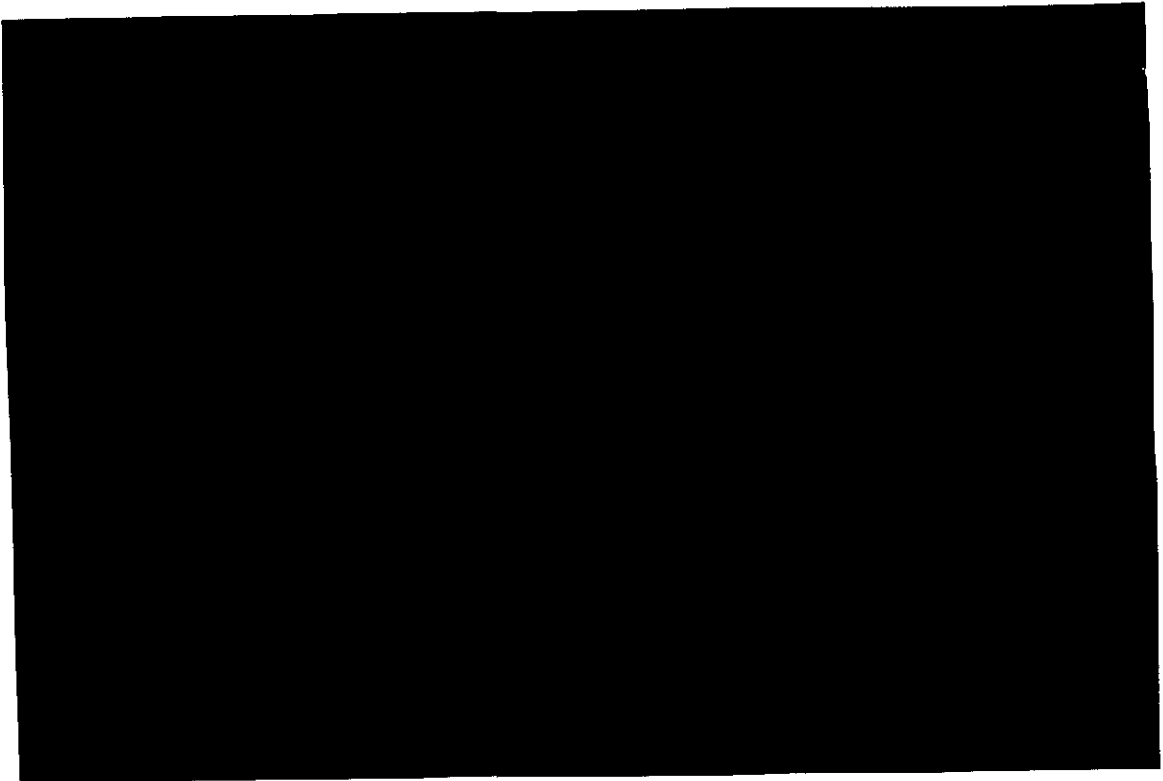
### **6.3. ESTUDIO DE LOS OVOCITOS Y EMBRIONES PRESENTES EN LOS CUERNOS UTERINOS.**

Una vez separados los oviductos de los cuernos uterinos, como se ha descrito anteriormente, una nueva sección realizada a nivel de la unión vaginal permite separar los cuernos uterinos. Una vez separados se introduce el catéter de perfusión por el orificio útero-tubárico que se originó al realizar la sección para separar los oviductos de los cuernos uterinos, y se procede a perfundirlos con DPBS con un volumen de 30 cc por cada uno de los cuernos.

De esta forma se obtienen conjuntamente ovocitos y embriones. Posteriormente se procede a la detección y conteo de los ovocitos (fotografía 5.4.) (NOC: ovocitos en cuernos uterinos), que no fueron clasificados de acuerdo a su calidad y de los blastocistos (NBC: blastocistos en cuernos uterinos) obtenidos, utilizando el mismo procedimiento y utillaje descritos en el punto anterior. Los blastocistos fueron clasificados de la forma en que se expondrá más adelante.



Fotografía 5.3. Ovario y oviducto de coneja en el que se puede observar la presencia de un folículo hemorrágico (1) y de un folículo preovulatorio (2).



Fotografía 5.4. Ovocito de buena calidad en el que se observa un corpúsculo polar íntegro.

#### **6.4. ESTUDIO DE LAS TASAS DE FECUNDACION (TF).**

La tasa de fecundación se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente expresión:

$$TF = [(NBO + NBC) / (NBO + NBC + NOO + NOC)] * 100$$

O sea que se calculó como el cociente existente entre el número de blastocistos en oviductos más el número de blastocistos en cuernos uterinos, dividido por la suma del total de blastocistos y ovocitos (por cien).

#### **6.5. ESTUDIO DE LOS BLASTOCISTOS.**

Los blastocistos fueron estudiados y clasificados de acuerdo a los criterios publicados en 1986 por L. Veeck y M. Malony (151) y que de forma resumida son los siguientes:

**EMBRIONES GRADO 1:** son embriones con las blastómeras de igual tamaño y que no presentan fragmentación citoplásmica.

**EMBRIONES GRADO 2:** son aquellos embriones que poseen blastómeras iguales de tamaño pero presentan fragmentación citoplásmica.

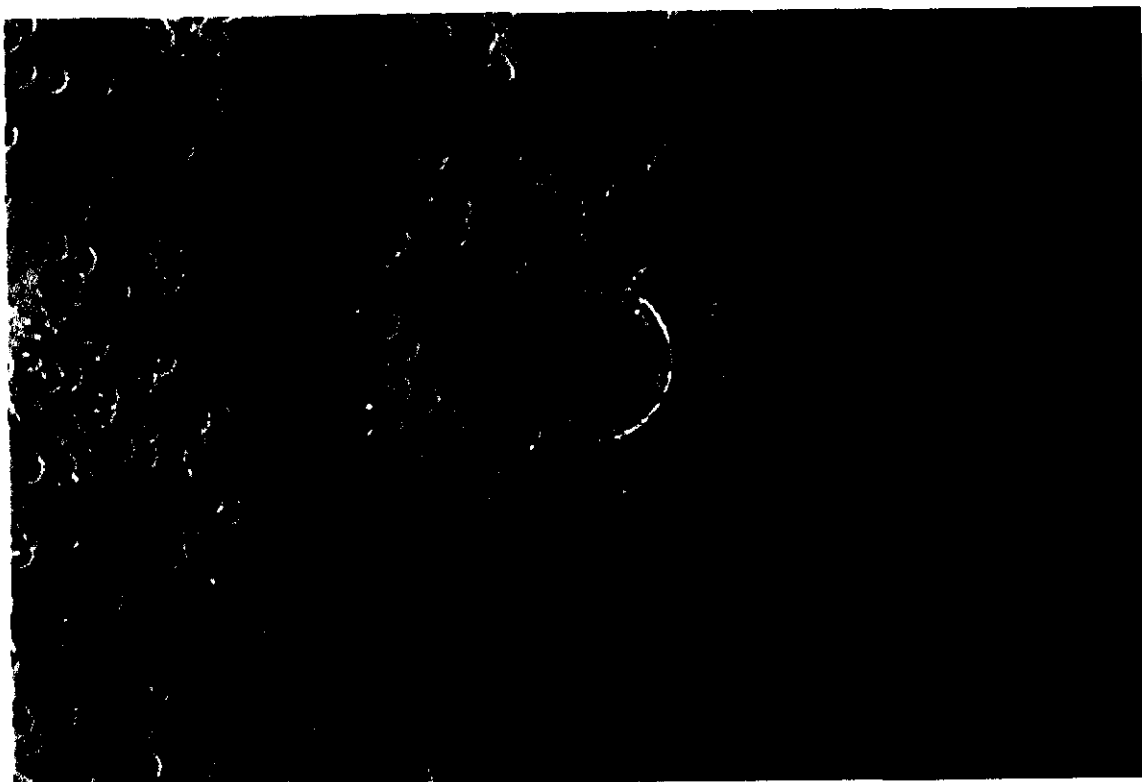
**EMBRIONES GRADO 3:** son embriones formados por blastómeras de distinto tamaño y que no presentan fragmentación citoplásmica.

**EMBRIONES GRADO 4:** son embriones compuestos por blastómeras de distinto tamaño

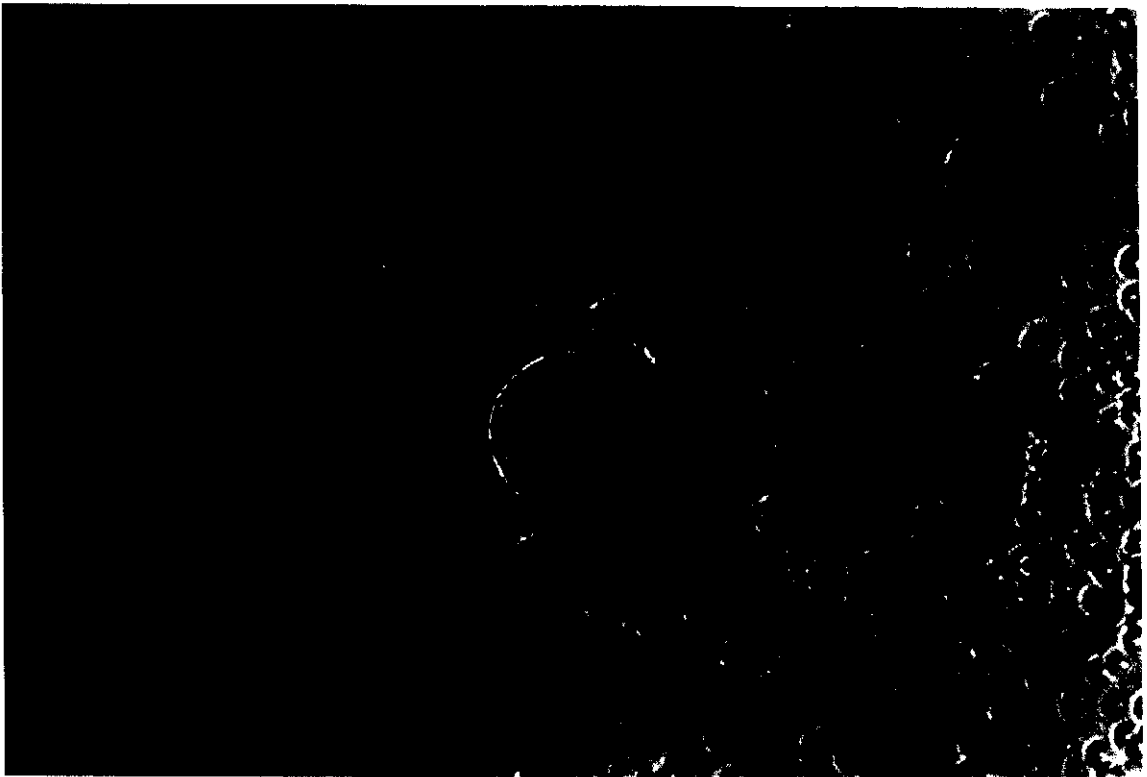
y que, además, presentan fragmentación citoplásmica.

**EMBRIONES GRADO 5:** sus blastómeras son irregulares y poseen fragmentación citoplásmica. Son embriones degenerados.

En el presente estudio se realizará la evaluación utilizando tres categorías en relación a la calidad de los blastocistos: la primera categoría fueron los embriones de buena calidad, que agrupa a los embriones de los grados 1 y 2 (E12); embriones de calidad intermedia, que agrupa a los embriones de los grados 3 y 4; finalmente y como tercera categoría, embriones grado 5 o degenerados. Las fotografías 5.5, 5.6. y 5.7. muestran embriones de las tres categorías, buena calidad, calidad intermedia y embriones degenerados respectivamente.



Fotografía 5.5. Embrión de buena calidad (Grados 1-2)



Fotografía 5.6. Embrión de calidad intermedia (Grados 3-4).



Fotografía 5.7. Embrión degenerado (Grado 5).

## **7. ESTUDIO DE IMPLANTACION Y PERDIDAS PRECOCES POSTIMPLANTATORIAS A LOS 14 DIAS DE LA INDUCCION DE LA OVULACION.**

Para el sacrificio de las hembras se procedió de forma idéntica que en los grupos sacrificados a las 72 horas. Una vez separado el tracto genital se procedió a determinar el número de cuerpos lúteos (foliculos con cicatriz ovulatoria) en los ovarios, tal y como se ha descrito previamente en el punto 5.1. (Fotografía 5.8.)

En los dos cuernos uterinos de cada una de las hembras procedimos a contabilizar el número de botones embrionarios presentes para determinar el número de embriones totales (ET); posteriormente se determinó cuantos embriones presentaron un desarrollo saludable, con vascularización tamaño y aspecto adecuado (ED, embriones en desarrollo) y cuantos estaban en proceso de reabsorción, siendo éstos considerados como embriones en regresión (ER).

**-EMBRIONES EN DESARROLLO:** se presentan como botones embrionarios bien vascularizados en los que se observa fácilmente la presencia de latido cardíaco, expresión de la existencia de una vesícula cardiogénica funcional. (Fotografía 5.9.)

**-EMBRIONES EN REGRESION:** se presentan como botones embrionarios más pequeños que los embriones en desarrollo, en proceso de reabsorción, con una vascularización pobre y en los que no se observa la presencia de latido cardíaco. (Fotografía 5.9.)





Fotografía 5.8. Ovario de coneja sacrificada a los 14 días de la inducción de la ovulación en el que son visibles los cuerpos lúteos.



Fotografía 5.9. Cuerno uterino correspondiente a una hembra sacrificada a los 14 días de la inducción de la ovulación. Se pueden observar 8 embriones en desarrollo y un embrión en regresión (ER).

## **CALCULO DE LAS TASAS DE IMPLANTACION**

**En base a los datos anteriores se procedió a calcular el porcentaje de implantación (% Imp.) de acuerdo a la siguiente expresión:**

$$\% \text{ Implantación} = [(ED+ER)/CL]*100$$

**En donde CL es el número de cuerpos lúteos y ED y ER el número de embriones en desarrollo y en regresión respectivamente, siendo el % de implantación resultado de dividir la suma de los embriones en desarrollo y regresión por el número de cuerpos lúteos, por cien.**

## **CALCULO DE LA TASA DE PERDIDAS PARCIALES A LOS 14 DIAS DE GESTACION.**

**También se calculó la tasa de pérdidas parciales postimplantatorias a los 14 días (PP14) de acuerdo a la expresión:**

$$PP14 = [ER/(ED+ER)]*100$$

**Siendo la pérdidas parciales a los 14 días el cociente existente entre el número de embriones en regresión a los 14 días y la adición del número de embriones en desarrollo y regresión, por cien.**

## **8. DETERMINACION DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA.**

Una vez obtenido el plasma, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Todas las muestras fueron congeladas a -24 grados centígrados hasta el momento de su procesamiento mediante radioinmunoanálisis.

Cada muestra fue procesada para determinación de estradiol y progesterona, en el Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid.

Tras la descongelación del plasma se procedió a agitar la muestra utilizando un agitador de la marca Heidolph (r). Posteriormente se tomó la cantidad exacta de muestra (100  $\mu$ l) con una micropipeta y se depositó en el fondo del tubo del kit para radioinmunoanálisis. Esta cantidad de muestra corresponde a la cantidad de cada uno de los tubos de la curva patrón, de tal forma que se trabajó con el mismo volumen en los tubos con muestra y en los de la curva. Una vez que todas las muestras estuvieron en sus tubos correspondientes, incluyendo las de los puntos de la curva patrón, se añadió la correspondiente hormona marcada y se procedió a la agitación de los tubos. Una vez que los tubos permanecieron a temperatura ambiente durante 3 horas, su contenido fue aspirado utilizando una bomba de vacío y posteriormente contados en un contador gamma de la empresa Packard, modelo Cobra Autogamma (Dawners Grove, Illinois, USA)

En relación a la hormona marcada utilizamos los siguientes volúmenes:

- 1 ml para la progesterona (=62.000 cpm)
- 800  $\mu$ l para el estradiol (=28.000 cpm)

Ello supuso un % de unión específica del 35 % en el análisis de la progesterona y del 49 % en el del estradiol.

Se practicó una única determinación para cada muestra aunque, por ser un factor crítico, para la determinación de los puntos de la curva patrón se hicieron dos determinaciones de cada muestra. Además, en relación a la curva patrón, en el kit de progesterona se practicaron tres puntos adicionales, intermedios entre los aconsejados por el fabricante.

El rango de la curva patrón fue para cada esteroide:

-Progesterona: desde 5 hasta 4.000 pg/ml

-Estradiol: desde 5 hasta 3.600 pg/ml

El sistema comercial de RIA utilizado fue el COAT-A-COUNT KIT (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, California, USA) cuyas características fueron las siguientes:

**\*ESTRADIOL:**

**SENSIBILIDAD: 0,8 pg/ml**

**VARIACION INTRAENSAYO: 5 %.**

**\*PROGESTERONA:**

**SENSIBILIDAD: 0,05 ng/ml**

**VARIACION INTRAENSAYO: 3 %.**

## **9. ANALISIS ESTADISTICO.**

Se realizó un estudio descriptivo en cada uno de los grupos (PMSG+LHr y PMSG+hCG). Los resultados obtenidos vienen expresados por la media y su error estandar ( $x \pm SEM$ ).

Previamente al estudio analítico se ha realizado el test de Kolmogorov-Smirnov como prueba de ajuste a una distribución de Gauss.

El nivel de significación estadística se estableció en  $\alpha = 0,05$ .

Para la realización del análisis estadístico utilizamos la base de datos biostatística Sigma.

### **ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS FOLICULARES EN LOS OVARIOS.**

Se procedió a realizar un estudio descriptivo de cada uno de los grupos (LHr o hCG), calculándose la media y el error estandar para cada uno de los siguientes parámetros:

- Número de cuerpos lúteos (72 horas y 14 días).
- Número de folículos preovulatorios (72 horas).
- Número de folículos hemorrágicos (72 horas).

Se compararon los valores obtenidos por ambos grupos del estudio (LHr vs hCG) mediante el test de Student para muestras independientes.

## **ESTUDIO DE LOS OVOCITOS, EMBRIONES Y TASAS DE FECUNDACION.**

**En los subgrupos de hembras sacrificados a las 72 horas efectuamos el estudio de los siguientes parámetros:**

**-Número de blastocistos en oviducto.**

**-Número de blastocistos en cuernos.**

**-Número de ovocitos en oviductos.**

**-Numero de ovocitos en cuernos.**

**-Tasa de fecundación.**

**Se procedió de igual forma que para los parámetros ováricos. La tasa de fecundación fue tratada como media de porcentajes, procediéndose a calcular también la media y el error estandar medio y comparándose ambos grupos (LHr vs hCG) mediante el test de Student para muestras independientes.**

## **ESTUDIO DE LOS PARAMETROS HORMONALES.**

**En las hembras sacrificadas a las 72 horas se tomaron muestras para determinación de estradiol y progesterona. Los parámetros hormonales fueron estudiados mediante la prueba de Student y adicionalmente se practicó el análisis de la varianza de una vía para series repetidas, con el fin de valorar los niveles de progesterona y estradiol en los distintos tiempos de determinación, 0, 24, 48 y 72 horas post-inducción de la ovulación con hCG o LHr.**

**Cuando el análisis de la varianza resultó significativo, se realizaron comparaciones de niveles**

a cada tiempo respecto del nivel basal mediante test de Student para muestras apareadas, previa realización de la corrección de Bonferroni.

En el caso de la progesterona se ha utilizado una transformación de tipo logarítmico como corrección a la dispersión observada en sus valores. Igualmente se ha procedido en las relaciones en las que la progesterona era uno de los componentes de la expresión.

#### **ESTUDIO DE IMPLANTACION Y PERDIDAS PARCIALES POSTIMPLANTATORIAS.**

En los subgrupos de hembras sacrificadas a los 14 días se procedió a estudiar los siguientes parámetros y tasas:

- Número de embriones en desarrollo.
- Número de embriones en regresión.
- Número de embriones totales.
- Tasa de implantación.
- Tasa de pérdidas parciales a los 14 días.

La tasa de implantación y la de pérdidas parciales postimplantatorias a los 14 días fueron tratadas como medias de porcentajes, siendo analizadas, como en el caso de los datos numéricos, de la misma forma que para los parámetros ováricos, ovocitarios y embrionarios.

#### **ESTUDIO DE CORRELACIONES.**

Con la finalidad de observar la posible relación entre los diferentes parámetros del estudio

se ha realizado un análisis de correlación de Pearson entre las variables del estudio. Utilizamos un método de correlaciones múltiples con el fin de elaborar unas tablas matriz que reflejen las posibles relaciones.

Los datos correlacionados fueron los correspondientes a los grupos que recibieron LHR y hCG, tanto los subgrupos estudiados a las 72 horas, como a los 14 días post-inducción de la ovulación.

También procedimos a estudiar las relaciones existentes entre los datos obtenidos a los 14 días de la administración del agente inductor de la ovulación y los siguientes de los obtenidos a las 72 horas, tanto en el grupo LHR como en el hCG:

- Progesterona a las 24 horas.
- Progesterona a las 48 horas.
- Estradiol a las 24 horas.
- Estradiol a las 48 horas.
- Embriones de buena calidad.
- Embriones de calidad intermedia.
- Embriones degenerados.

Independientemente del grado de significación estadística del coeficiente de correlación, en el presente estudio consideramos un buen nivel de relación cuando el coeficiente de correlación es igual o mayor a  $\pm 0,7$ .



## **6. RESULTADOS**

## **1. ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO.**

### **1.1. ESTUDIO DE LOS DATOS OVARICOS Y EMBRIONARIOS OBTENIDOS EN LAS HEMBRAS SACRIFICADAS A LAS 72 HORAS DE LA INDUCCION DE LA OVULACION.**

En total se estudiaron 20 hembras sacrificadas 72 horas después de la inducción de la ovulación, con PMSG y la maduración final del ovocito, de las que 10 recibieron LH recombinante y otras 10 hCG. De las 10 hembras que recibieron LH la ovulación se produjo en 9, mientras que entre las 10 en que se administró hCG ovularon 8. Por lo tanto para algunos de los parámetros biológicos analizados, que son consecuencia directa de la ovulación, el tamaño de la muestra utilizado para el análisis estadístico depende del número de animales con ovulación positiva en cada grupo.

En la tabla 6.I. se muestra el número de animales de cada grupo en los que tras el sacrificio realizado a las 72 horas existían cuerpos lúteos (CL), folículos hemorrágicos (FH), folículos preovulatorios (FP) y el potencial ovulatorio (Pot) resultado de la adición del número de cuerpos lúteos + folículos preovulatorios; en relación a los gametos y blastocistos la tabla muestra para cada grupo los animales que presentaron blastocistos en oviducto (B0), blastocistos en cuernos uterinos (BC) y ovocitos en cuernos uterinos (OC). Ninguna hembra presentó ovocitos en oviducto. En consecuencia no haremos más referencia a este parámetro en este apartado. Por último se expresa el número de hembras de cada grupo con embriones de buena calidad (E1-2), embriones de calidad intermedia 3 y 4 (E3-4) y embriones degenerados (E5).

	CL	FH	FP	Pot	BO	BC	OC	E1-2	E3-4	E5
LHr	9	4	9	10	3	8	5	9	9	4
hCG	8	7	4	10	8	4	7	8	8	8

Tabla 6.I. Número de animales que recibieron LHr o hCG en los que se determinó la existencia de los parámetros señalados. CL: cuerpos lúteos; FH: folículos hemorrágicos; FP: folículos preovulatorios; Pot: cuerpos lúteos+folículos preovulatorios (potencial ovulatorio); BO: blastocistos en oviductos; BC: blastocistos en cuernos uterinos; OC: ovocitos en cuernos; E1-2: embriones grados 1 y 2; E3-4: embriones grados 3 y 4; E%: embriones degenerados.

La tasa de recuperación, definida como el número total de gametos y cigotos recuperados en relación al número de cuerpos lúteos y expresada en porcentaje, fue del 100 % en las hembras sacrificadas a las 72 horas, tanto en la población que recibió hCG como en la que recibió LHr.

### 1.1.1. CUERPOS LUTEOS.

El número medio de folículos que ovularon y sufrieron una transformación en cuerpo lúteo fue para el grupo tratado con LH de  $8,1 \pm 0,87$ , mientras que para el grupo hCG fue de  $13,1 \pm 0,76$ . La diferencia alcanzó una elevada significación estadística con una  $p < 0,001$  (Tabla 6.II., Figura 6.1.).

### 1.1.2. FOLICULOS PREOVULATORIOS.

La presencia de folículos que no habían llegado a ovular con el tratamiento y que, cuando se realizó el estudio a las 72 horas, se encontraban en estadio preovulatorio mostró diferencias importantes entre los dos grupos de tratamiento. En el grupo tratado con LH la media fue de  $8,2 \pm 1,43$  mientras que para el grupo tratado con hCG la media fue notablemente inferior, situándose en  $1,8 \pm 0,85$ . La diferencia fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabla 6.II., Figura 6.1.).

### 1.1.3. FOLICULOS HEMORRAGICOS.

La media observada de folículos hemorrágicos fue semejante en ambos grupos de tratamiento, siendo de  $3,6 \pm 1,5$  para el grupo tratado con LH y de  $3,9 \pm 2,13$  para el tratado con hCG (Tabla 6.II., Figura 6.1.).

Parámetro	Grupo LH ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
C. Lúteos	$8,1 \pm 0,87$	$13,1 \pm 0,76$	0,0006767	$p < 0,001$
F. hemorrág.	$3,6 \pm 1,50$	$3,9 \pm 2,13$	0,90978	NS
F. preovulat.	$8,2 \pm 1,43$	$1,8 \pm 0,85$	0,0012244	$p < 0,01$
C. Lúteos + F. preovulat.	$15,5 \pm 1,43$	$12,3 \pm 1,25$	0,11128	NS

Tabla 6.II. Parámetros ováricos estudiados en ambos grupos de tratamiento, LHr y hCG.  
NS: no significativo.

## PARAMETROS OVARICOS A LAS 72 HORAS

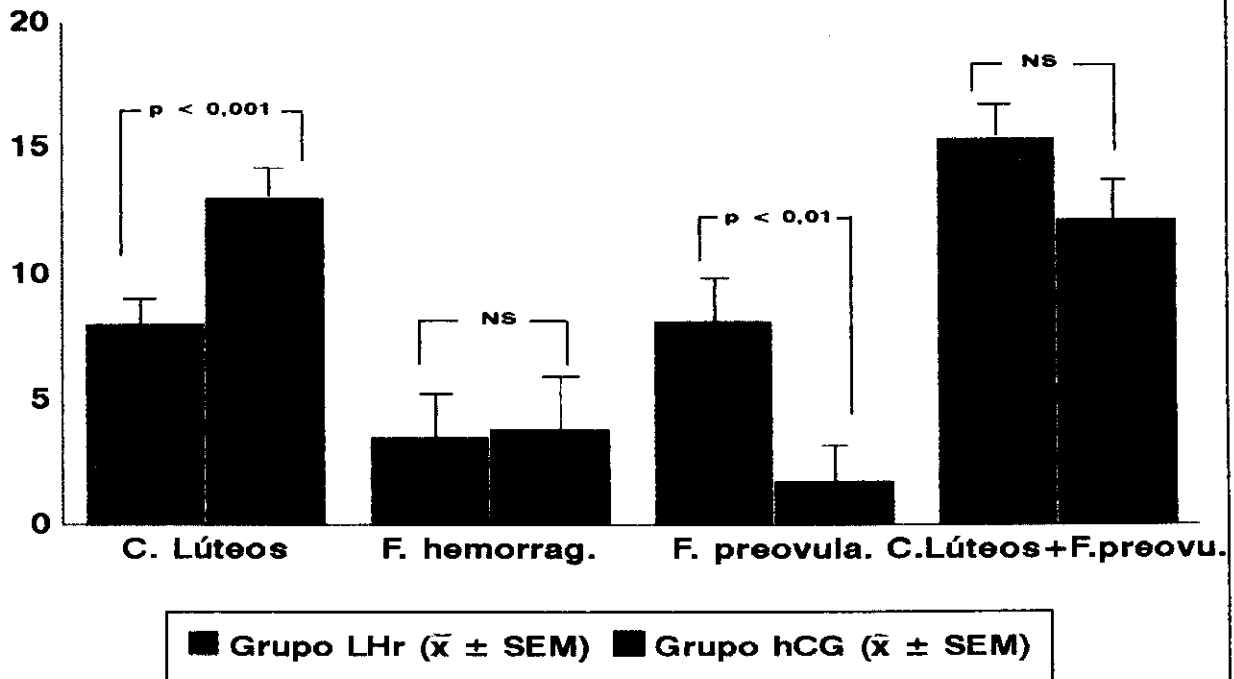


Figura 6.1.

### 1.1.4. ESTUDIO DEL POTENCIAL OVULATORIO.

El potencial ovulatorio (cuerpos lúteos + folículos preovulatorios) presentó unos valores medios de  $15,5 \pm 1,43$  en el grupo LH, siendo en el grupo hCG de  $12,3 \pm 1,25$ , no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 6.II., Figura 6.1.).

### 1.1.5. ESTUDIO DE LOS BLASTOCISTOS PRESENTES EN OVIDUCTOS.

El número medio de blastocistos en los oviductos fue mayor en el grupo tratado con hCG que en el tratado con LH. Así en éste último fue de  $2,4 \pm 1,43$  blastocistos mientras que en el de hCG fue de  $9,0 \pm 1,86$ . La diferencia alcanzó significación estadística ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.III., Figura 6.2.).

### **1.1.6. ESTUDIO DE LOS BLASTOCISTOS PRESENTES EN LOS CUERNOS UTERINOS.**

En el grupo tratado con LH el número de blastocistos presentes en los cuernos uterinos a las 72 horas de la administración de la hormona fue de  $5,1 \pm 0,94$ . Para el grupo tratado con hCG la media fue de  $2,9 \pm 1,21$ . A pesar del mayor número de blastocistos presentes en cuernos para los casos tratados con LH, la diferencia no alcanzó significación estadística (Tabla 6.III., Figura 6.2.)

### **1.1.7. ESTUDIO DE LOS OVOCITOS PRESENTES EN LOS CUERNOS UTERINOS.**

Los ovocitos presentes en los cuernos uterinos ofrecieron, para el grupo tratado con LH, una media de  $0,5 \pm 0,17$ ; en el grupo hCG la media fue superior, concretamente  $1,2 \pm 0,25$ . La diferencia mostró significación estadística ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.III., Figura 6.2).

### **1.1.8. TOTAL DE EMBRIONES.**

El número total medio de embriones fue de  $7,6 \pm 0,97$  en el grupo LHR y de  $11,9 \pm 0,97$  en el grupo hCG. La diferencia resultó estadísticamente significativa (Tabla 6.III.)

### **1.1.9. ESTUDIO DE LAS TASAS DE FECUNDACION**

La tasa de fecundación media ( $[(NBO+NBC)/(NBC+NBO+NOC)]*100$ ) fue, para el grupo de animales en los que se indujo la ovulación con LH, del  $91,1 \pm 3,17$  % (media de porcentajes); en el grupo tratado con hCG fue ligeramente inferior, situándose en el  $89,6 \pm 2,48$ . No se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Tabla 6.III., Figura 6.2).

Parámetro	Grupo LH ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	Grupo hCG ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	P	
NBO	2,4 $\pm$ 1,43	9,0 $\pm$ 1,86	0,01281	P<0,05
NBC	5,1 $\pm$ 0,94	2,9 $\pm$ 1,21	0,16324	NS
NOC	0,5 $\pm$ 0,17	1,2 $\pm$ 0,25	0,035264	P<0,05
NBTot	7,6 $\pm$ 0,97	11,9 $\pm$ 0,97	0,007	p<0,01
TF (%)	91,1 $\pm$ 3,17	89,6 $\pm$ 2,48	0,71205	NS

Tabla 6.III. Comparación de los blastocistos y ovocitos presentes en los oviductos y cuernos uterinos de los animales tratados con LHr o con hCG. NBO: número de blastocistos en oviductos. NBC: número de blastocistos en cuernos uterinos. NOC: número de ovocitos en cuernos uterinos. NBTot: blastocistos totales TF: tasa de fecundación NS: no significativo.

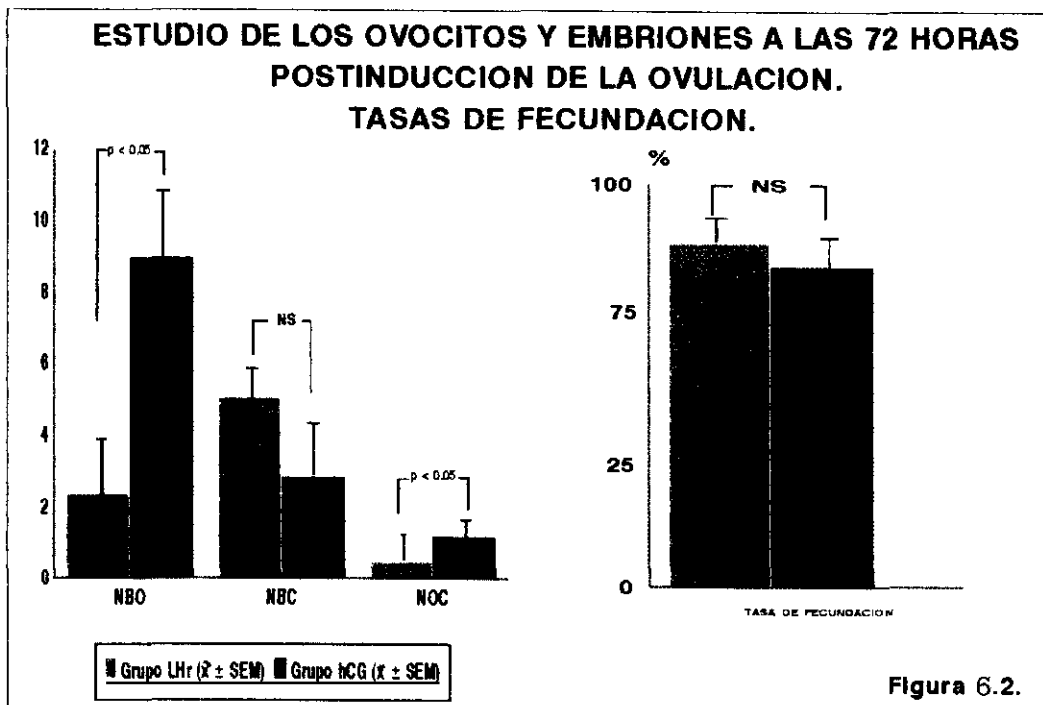


Figura 6.2.



### **1.1.10. ESTUDIO DE LA CALIDAD EMBRIONARIA.**

Para el estudio de los embriones, estos se agruparon en 3 categorías distintas, de mayor a menor calidad, que fueron: embriones de buena calidad (grados 1 y 2), embriones de calidad intermedia (grados 3 y 4) y finalmente embriones de grado 5 o degenerados. Todos los porcentajes que se expresan a continuación son medias de los mismos.

El estudio de la calidad embrionaria mostró, para el grupo tratado con LH los siguientes resultados: el  $67,8 \pm 5,26$  % de los embriones fueron de grado 1-2; el  $26,6 \pm 4,85$  % lo fueron de grado 3-4 y únicamente el  $5,6 \pm 2,25$  % fueron embriones degenerados (embriones grado 5).

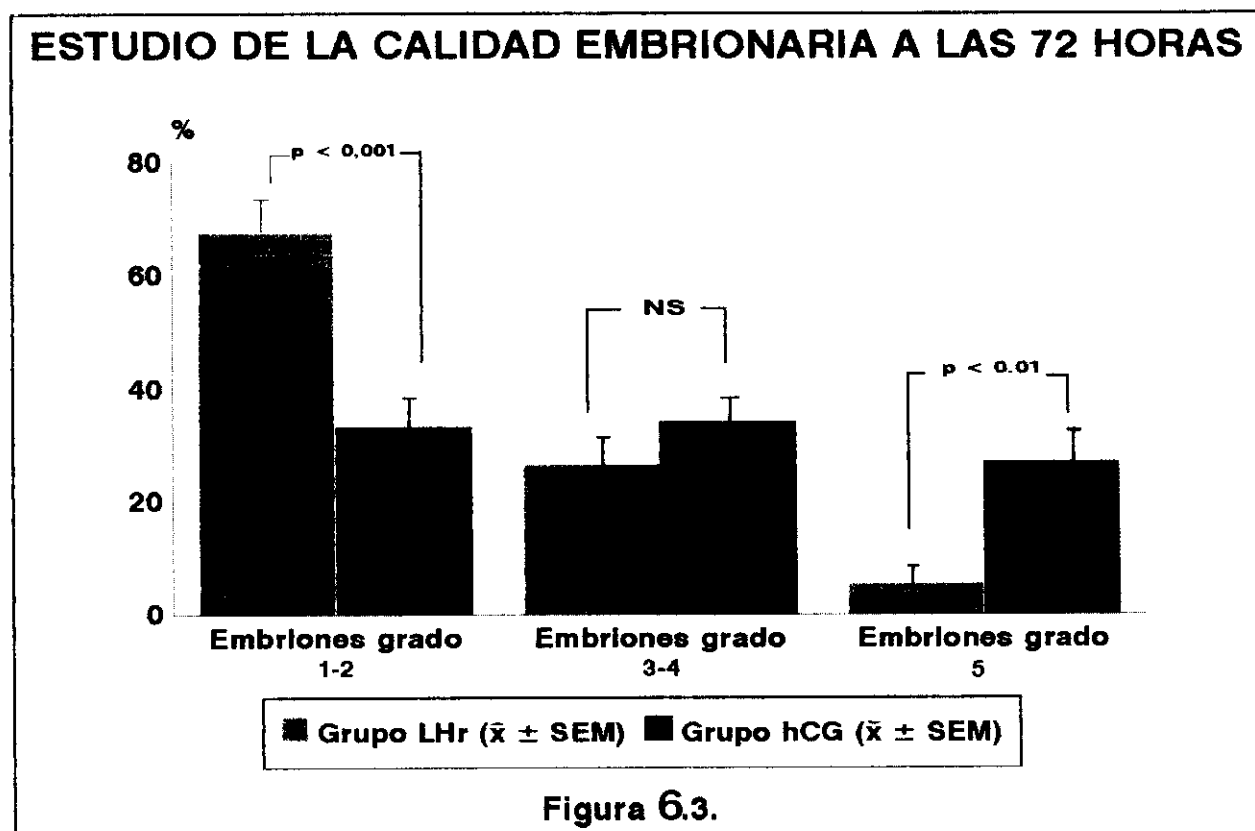
En el grupo tratado con hCG los resultados difirieron notablemente en relación al grupo LH. Así los embriones de grado 1 y 2 supusieron el  $33,5 \pm 3,01$  % del total; los embriones de grado 2 y 3 fueron el  $34,1 \pm 3,26$  %, mientras que los degenerados (grado 5) fueron el  $27,3 \pm 4,7$  %.

Las diferencias observadas en relación a la calidad embrionaria entre los grupos alcanzó significación estadística, tanto para los embriones de mejor calidad (Grados 1-2), que supusieron un porcentaje significativamente superior en el grupo tratado con LH ( $p < 0,001$ ) en relación al grupo tratado con hCG, como para los embriones degenerados (grado 5), resultando una proporción significativamente mayor en el grupo tratado con hCG en comparación con el grupo tratado con LH ( $p < 0,01$ ) (Tabla 6.IV., Figura 6.3.)

Parámetro	Grupo LHr ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
Embriones grado 1-2 (%)	67,8 $\pm$ 5,26	33,5 $\pm$ 3,01	0,00006692	p<0,001
Embriones grado 3-4 (%)	26,6 $\pm$ 4,85	34,1 $\pm$ 3,26	0,23208	NS
Embriones Grado 5 (%) (degenerados)	5,6 $\pm$ 2,25	27,3 $\pm$ 4,7	0,0016498	p<0,01

Tabla 6.IV. Grado de calidad embrionaria obtenida tras cada uno de los tratamientos, LH o hCG.

NS: no significativo



## **1.2. ESTUDIO HORMONAL HASTA LAS 72 HORAS POSTINDUCCION DE LA OVULACION.**

### **1.2.1. ESTRADIOL**

Los niveles de estradiol mostraron un perfil bifásico, con un descenso inicial respecto a los valores preovulatorios y un ascenso posterior en el que se alcanzaron valores superiores a los preovulatorios a las 72 horas del desencadenamiento de la ovulación. Este fenómeno se produjo en los dos grupos de tratamiento, LH y hCG.

En el grupo LH el valor preovulatorio del estradiol sérico fue de  $21,8 \pm 4,7$  pg/ml, alcanzándose su valor mínimo a las 24 horas que resultó ser de  $9,5 \pm 1,7$  pg/ml. A partir de ese momento se inició un ascenso que alcanzó un máximo de  $23,9 \pm 3,2$  pg/ml a las 72 horas de la administración de la LH (Tabla 6.V.). Considerado el grupo de forma global, el análisis de la varianza puso de manifiesto que, tanto el descenso inicial como el posterior ascenso de los niveles de estradiol, fueron estadísticamente significativos respecto a sus valores preovulatorios ( $p < 0,05$ ). No se encontró significación estadística cuando se estudió cada uno de los momentos en que se determinó esta hormona en relación al valor preovulatorio (Figura 6.4.).

En el grupo tratado con hCG el nivel preovulatorio de estradiol fue de  $19,1 \pm 3$  pg/ml. A diferencia del grupo tratado con LH, en éste el valor mínimo de estradiol se detectó a las 48 horas siendo de  $10,1 \pm 2$  pg/ml. A las 72 horas los niveles de este esteroide fueron de  $26,3 \pm 5,1$  pg/ml (Tabla 6.V.). Globalmente tanto el descenso inicial como el incremento posterior

fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.01$ ; ANOVA).

Cuando se analizó cada uno de los valores postovulatorios del estradiol en relación a los valores preovulatorios se pudo constatar que, tanto a las 24 como a las 48 horas, el descenso mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,016$  y  $p = 0,006$  respectivamente) (Figura 6.5.).

Aunque los niveles mínimos de estradiol se alcanzaron en momentos distintos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con LH y el grupo tratado con hCG, en ninguno de los momentos en que se determinó este esteroide.

Tiempo de determinación	Grupo LHr (pg/ml) ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG (pg/ml) ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P
0 horas	21,8±4,7	19,1±3,0	0,63788 NS
24 horas	9,5±1,7	11,8±1,3	0,29664 NS
48 horas	11,1±2,1	10,1±2,0	0,71702 NS
72 horas	23,9±3,2	26,3±5,1	0,69595 NS

Tabla 6.V. Valores medios de estradiol sérico previos a la administración de LHr (n=10) o de hCG (n=10) y evolución posterior en cada uno de los grupos. NS: no significativo.

### EVOLUCION DEL ESTRADIOL TRAS LA ADMINISTRACION DE LHr.

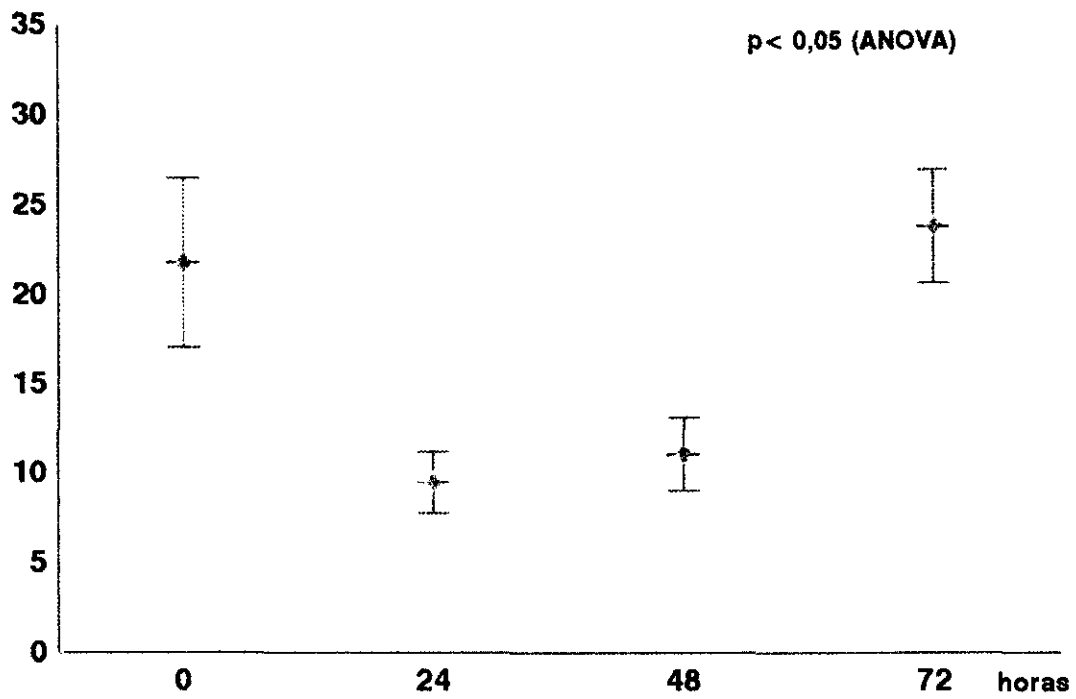
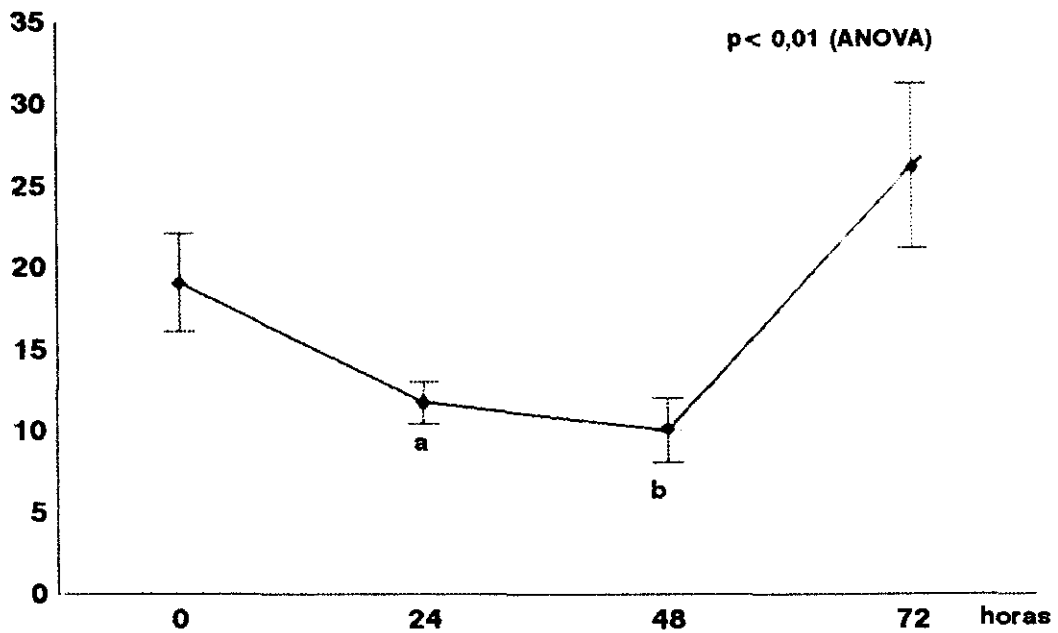


Figura 6.4.

### EVOLUCION DEL ESTRADIOL TRAS LA ADMINISTRACION DE hCG.



(a)  $p=0,016$  respecto a 0 horas (b)  $p=0,006$  respecto a 0 horas

Figura 6.5.

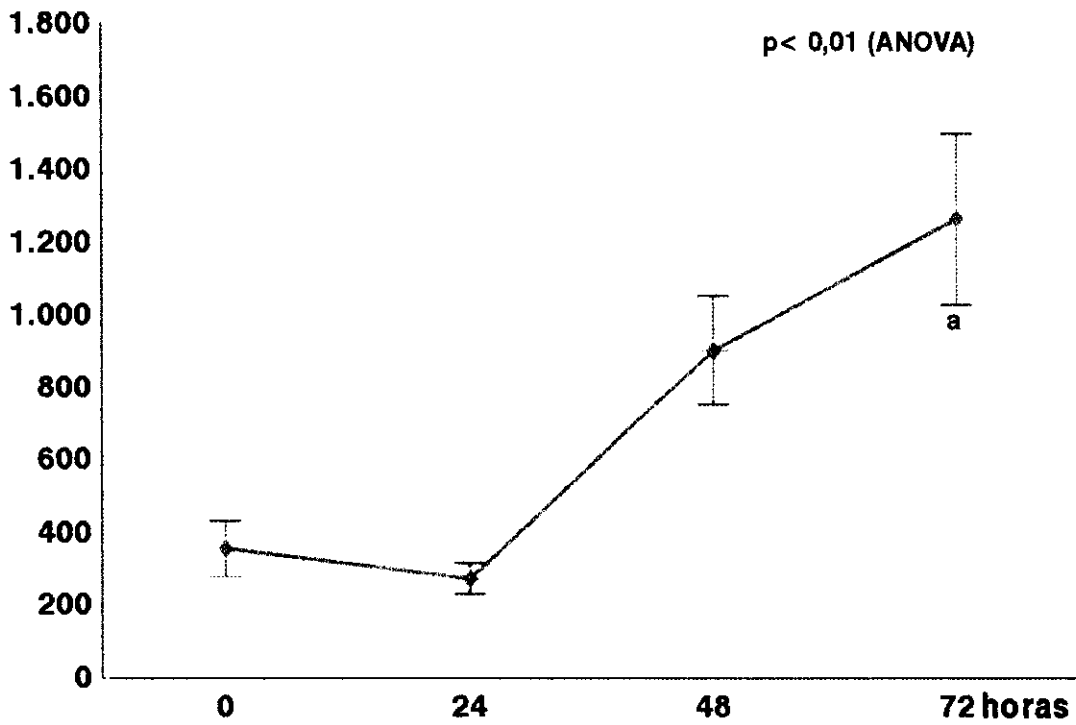
progesterona considerado globalmente resultó estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ; ANOVA). El incremento operado por esta hormona respecto a la basal resultó significativo tanto a las 24 horas ( $p = 0,0006$ ) como a las 48 horas ( $p = 0,00009$ ) y a las 72 horas ( $p = 0,001$ ) (Figura 6.7.).

Cuando se estudiaron las diferencias existentes entre el grupo tratado con LH y el grupo tratado con hCG, se pudo establecer que los niveles de progesterona a las 24 horas postovulación fueron significativamente mayores en el grupo tratado con hCG que en el grupo tratado con LH ( $p < 0,05$ ). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni a las 48 ni a las 72 horas entre los dos grupos (Tabla 6.VI.)

Tiempo de la determinación	Grupo LHr (pg/ml) ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG (pg/ml) ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
0 horas	356,3 $\pm$ 76,9	169,0 $\pm$ 32,9	0,15282	NS
24 horas	272,5 $\pm$ 42,7	537,0 $\pm$ 95,8	0,02017	p<0,05
48 horas	902,0 $\pm$ 150,6	1131,0 $\pm$ 146,1	0,37093	NS
72 horas	1265,5 $\pm$ 234,6	1381,5 $\pm$ 230,9	0,95542	NS

Tabla 6.VI. Valores de progesterona previos a la administración de LHr (n=10) y de hCG (n=10) y evolución posterior de los mismos (valor de P calculado mediante transformación logarítmica.)  
NS: no significativo.

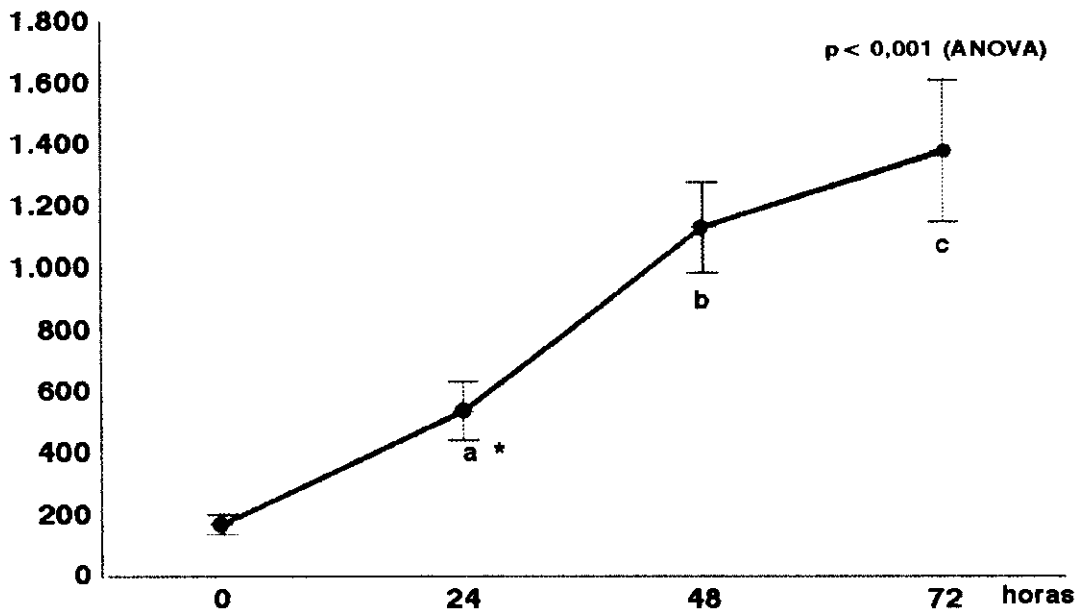
### EVOLUCION DE LA PROGESTERONA TRAS LA ADMINISTRACION DE LHr.



(a)  $p=0,009$  respecto a 0 horas

Figura 6.6.

### EVOLUCION DE LA PROGESTERONA TRAS LA ADMINISTRACION DE hCG.



(a)  $p=0,0006$  respecto a 0 horas    (c)  $p=0,001$  respecto a 0 horas  
(b)  $p=0,00009$  respecto a 0 horas    (\*)  $p < 0,05$  respecto a LHr

Figura 6.7.

### **1.2.3. RELACION ESTRADIOL/PROGESTERONA**

**La relación estradiol/progesterona mostró una reducción respecto a su valor preovulatorio en ambos grupos de tratamiento, LH y hCG.**

**En el grupo tratado con LH la relación estradiol/progesterona preovulatoria fue de  $0,16 \pm 0,08$ . A las 24 horas mostró una reducción que alcanzó su mínimo a las 48 horas, momento en que el valor de este cociente fue de  $0,01 \pm 0,0001$ . A las 72 horas operó un ligero incremento (Tabla 6.VII.) El análisis de la varianza no puso de manifiesto la existencia de cambios estadísticamente significativos, ni considerando los datos globalmente, ni en cada uno de las determinaciones postovulatorias respecto a la preovulatoria (Figura 6.8.).**

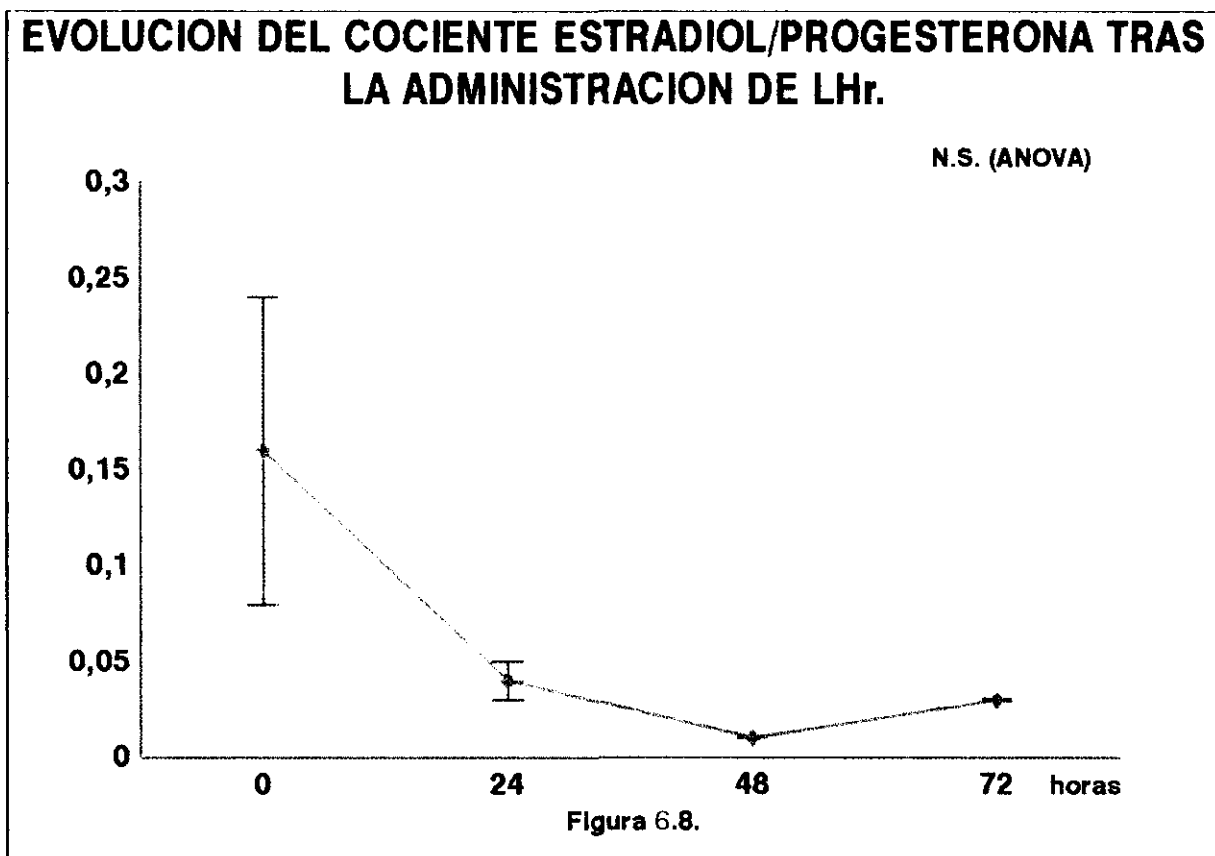
**En el grupo tratado con hCG la relación estradiol/progesterona antes de la administración de la hormona fue de  $0,19 \pm 0,06$ . La evolución de esta relación fue paralela a la observada en el grupo tratado con LH: a las 24 horas había descendido a  $0,03 \pm 0,0056$  alcanzándose sus valores mínimos a las 48 horas en que fue de  $0,01 \pm 0,002$ , para posteriormente, a las 72 horas, incrementarse levemente (Tabla 6.VII.) En este grupo de tratamiento las variaciones globales de la relación estradiol/progesterona alcanzaron significación estadística ( $p < 0,01$ ; ANOVA), aunque la comparación individual de cada uno de los valores postovulatorios con el valor previo a la administración de la hCG no mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Figura 6.9.).**



No se detectó la presencia de diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron los distintos valores del cociente estradiol/progesterona entre los grupos tratados con LH y hCG.

Tiempo de determinación	Grupo LHr ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
0 horas	0,16 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,06	0,3167	NS
24 horas	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,006	0,2444	NS
48 horas	0,01 $\pm$ 0,0001	0,01 $\pm$ 0,002	0,1379	NS
72 horas	0,03 $\pm$ 0,0006	0,04 $\pm$ 0,02	0,972	NS

Tabla 6.VII. Valores de los cocientes estradiol/progesterona en el grupo que recibió LHr (n=10) y en el que recibió hCG (n=10)  
NS: no significativo (valor de P: transf. logarítmica)



### EVOLUCION DEL COCIENTE ESTRADIOL/PROGESTERONA TRAS LA ADMINISTRACION DE hCG.

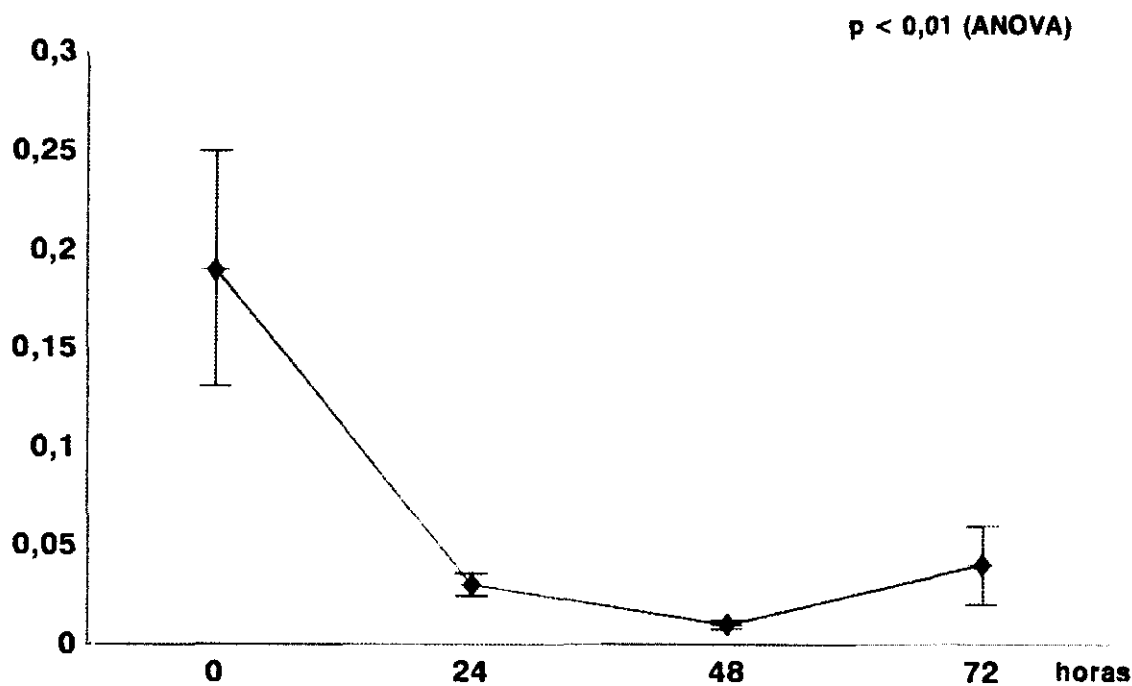


Figura 6.9.

#### 1.2.4. PROGESTERONA EN RELACION A LOS CUERPOS LUTEOS.

La progesterona por cuerpo lúteo operó un incremento postovulatorio en ambos grupos de tratamiento, especialmente importante a partir de las 48 horas de la administración de la LH o de la hCG.

En el grupo tratado con LH el cociente de la progesterona/cuerpos lúteos (observados a las 72 horas) fue de  $48,4 \pm 13,1$  pg por cuerpo lúteo (CL), tras un descenso no significativo a las 24 horas ( $39,1 \pm 7,4$  pg/CL), se produjo un incremento de sus valores a las 48 horas hasta  $113,6 \pm 16,1$  pg/CL y a las 72 horas hasta  $160,1 \pm 24,5$  pg/CL (Tabla 6.VIII.). Las variaciones en este cociente respecto a sus valores previos, consideradas globalmente, mostraron significación estadística ( $p < 0,01$ ; ANOVA). A las 72 horas de la administración de la LH la

progesterona por cuerpo lúteo fue significativamente superior a la preovulatoria ( $p=0,005$ ) (Figura 6.10.).

En el grupo tratado con hCG el cociente progesterona/cuerpo lúteo en el momento 0 fue de  $12,5 \pm 2,9$  pg/CL. Al contrario de lo sucedido en el grupo LH, a las 24 horas mostró un incremento de sus valores hasta  $51,7 \pm 11,8$  pg/CL, que fue significativo respecto a los valores preovulatorios ( $p=0,003$ ). A las 48 horas fue de  $102,5 \pm 6,6$  pg ( $p=0,000001$  respecto a valores preovulatorios), y a las 72 horas fue de  $129,5 \pm 8,6$  pg ( $p=0,000024$ ). Globalmente el incremento de la progesterona por cuerpo lúteo alcanzó significación estadística ( $p < 0,01$ ; ANOVA) (Tabla 6.VIII., Figura 6.11.).

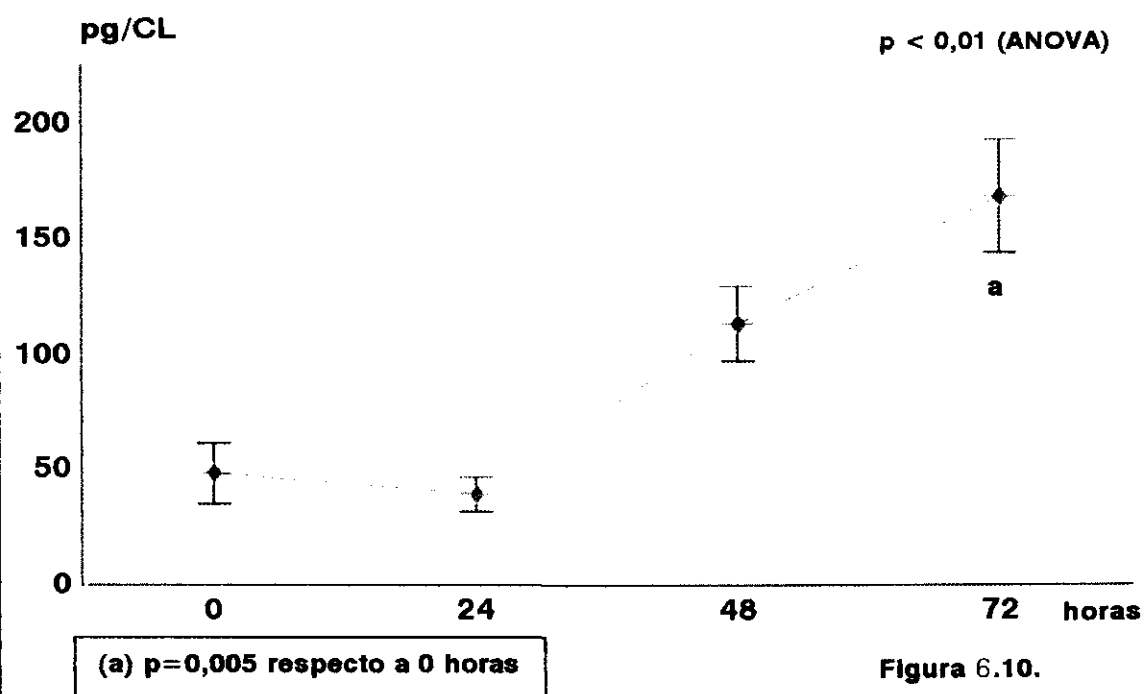
El cociente progesterona/cuerpo lúteo en el momento 0 fue significativamente mayor en el grupo LH que en el hCG ( $p < 0,05$ ). Aunque el perfil de la progesterona por cuerpo lúteo fue distinto en cada grupo de tratamiento, con valores superiores para el grupo hCG a las 24 horas, e inferiores a las 48 y 72 horas respecto al grupo LH, las diferencias existentes entre los grupos no mostraron significación estadística (Tabla 6.VIII.).

Tiempo de determinación	Grupo LHr pg/CL ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG pg/CL ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
0 horas	$48,4 \pm 13,1$	$12,5 \pm 2,9$	0,02956	$p < 0,05$
24 horas	$39,0 \pm 7,4$	$51,7 \pm 11,8$	0,32444	NS
48 horas	$113,6 \pm 16,1$	$102,5 \pm 6,6$	0,91333	NS
72 horas	$160,1 \pm 24,5$	$129,5 \pm 8,6$	0,57688	NS

Tabla 6.VIII. Evolución de la progesterona por cuerpo lúteo en las 9 conejas del grupo LHr y en las 8 del grupo hCG que mostraron cuerpos lúteos a las 72 horas de la administración de la hormona correspondiente (valor de P: transformación logarítmica)

CL: cuerpo lúteo NS: no significativo.

**EVOLUCION DE LA PROGESTERONA POR CUERPO LUTEO TRAS LA ADMINISTRACION DE LHr.**



**EVOLUCION DE LA PROGESTERONA POR CUERPO LUTEO TRAS LA ADMINISTRACION DE hCG.**

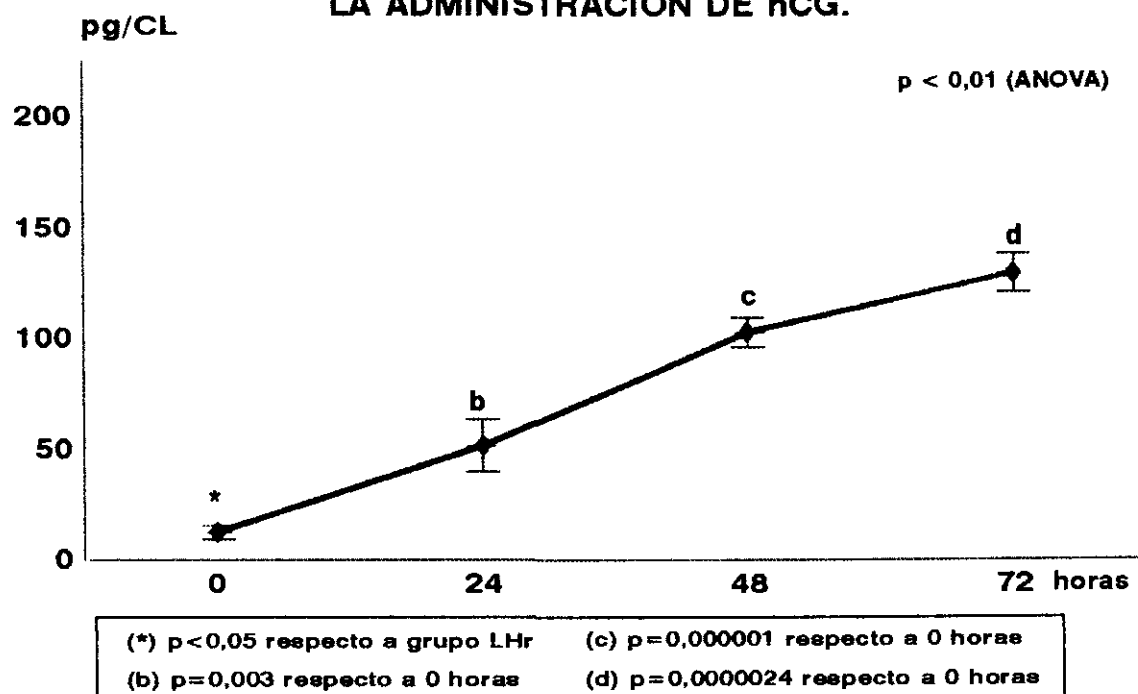


Figura 6.11.

### **1.2.5. RELACION DE LA PROGESTERONA CON EL POTENCIAL OVULATORIO.**

La relación progesterona/potencial ovulatorio (cuerpos lúteos + foliculo preovulatorios -Pot-) muestra un incremento a las 72 horas en ambos grupos de tratamiento, aunque el comportamiento es distinto en cada uno de los grupos.

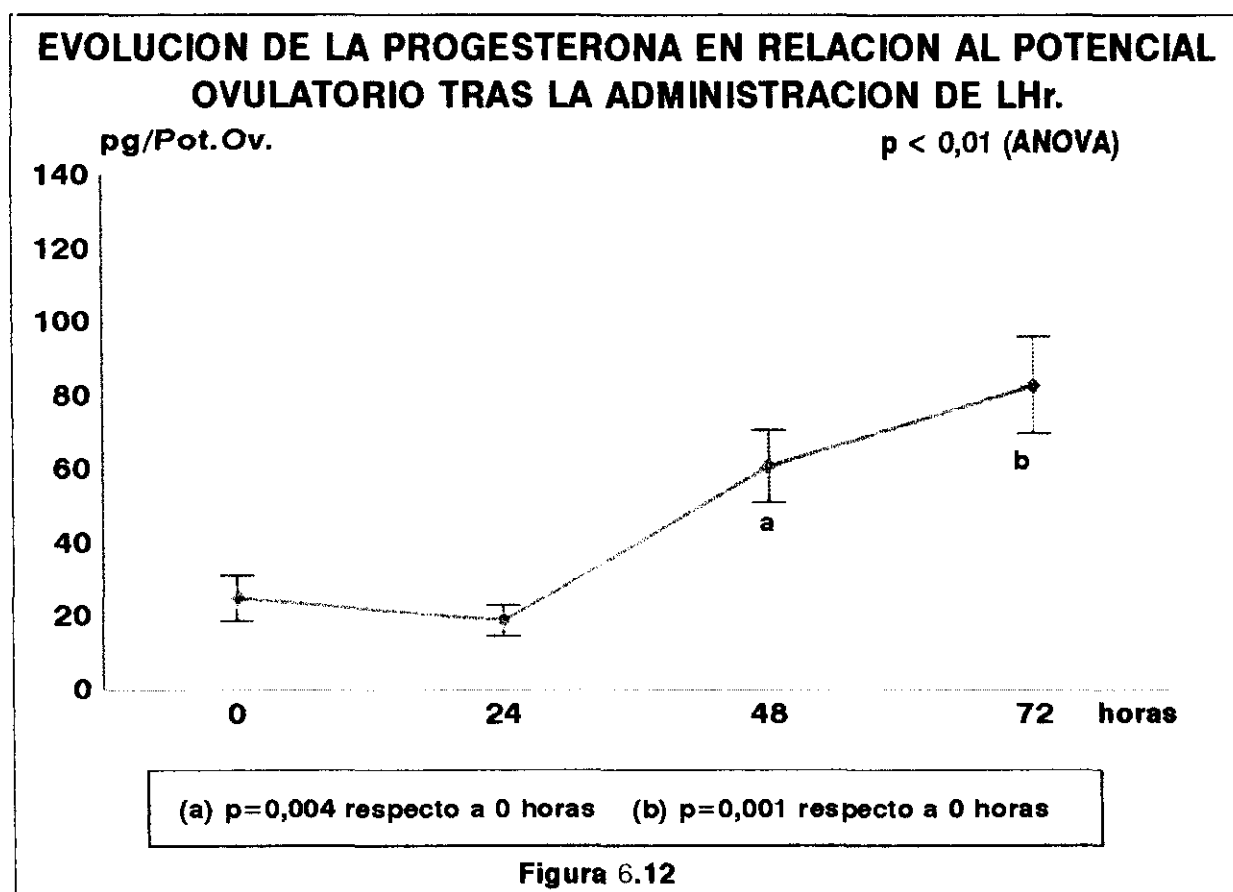
En el grupo de animales tratado con LH los valores preovulatorios fueron de  $25,1 \pm 6,2$  pg/Pot. descendiendo a las 24 horas de su administración ( $19 \pm 4,2$  pg/Pot.) e incrementándose posteriormente hasta  $61 \pm 9,9$  pg/Pot a las 48 horas ( $p = 0,004$  respecto a valores preovulatorios) y a  $83 \pm 13,1$  pg/Pot a las 72 horas ( $p=0,001$ ). Globalmente las variaciones fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 6.IX., Figura 6.12.)

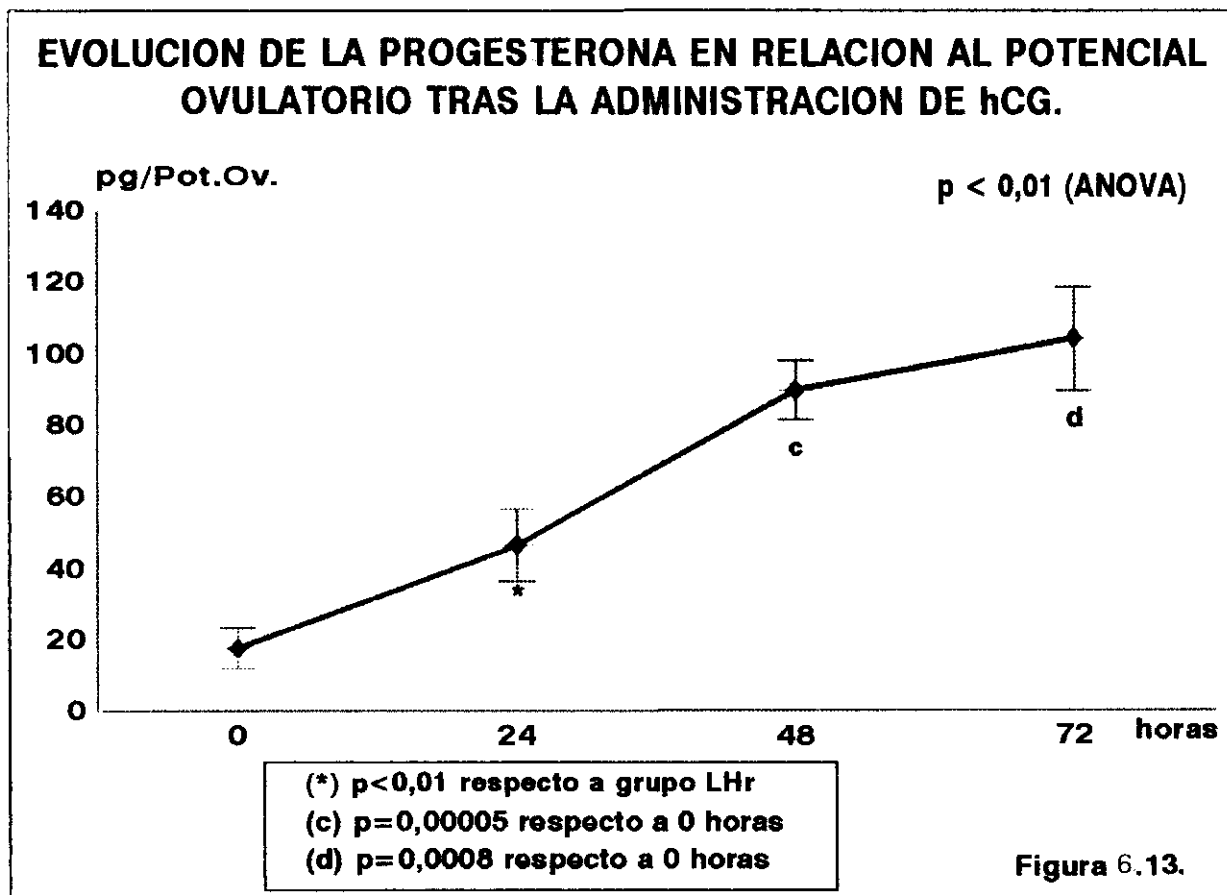
En el grupo de animales tratados con hCG, a diferencia del grupo tratado con LH, la relación progesterona/potencial ovulatorio ya se había incrementado a las 24 horas respecto a la basal ( $46,5 \pm 9$  vs  $17,6 \pm 5,8$  pg) siendo los incrementos estadísticamente significativos respecto al valor preovulatorio a las 48 horas ( $90 \pm 8,2$  pg;  $p=0,00005$ ) y a las 72 horas ( $104 \pm 14,4$  pg;  $p=0,0008$ ). Las variaciones globales postovulatorias fueron significativas ( $p < 0,01$ ) (Figura 6.13).

El incremento de este parámetro fue significativamente mayor en el grupo tratado con hCG que en el tratado con LH a las 24 horas ( $p < 0,05$ ) y casi significativo a las 48 horas ( $p < 0,1$ ), perdiéndose toda significación a las 72 horas (Tabla 6.IX.).

Tiempo de determinación	Grupo LHr pg/Pot ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	Grupo hCG pg/Pot ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	P	
0 horas	25,1 $\pm$ 6,2	17,5 $\pm$ 5,8	0,47185	NS
24 horas	19,0 $\pm$ 4,2	46,5 $\pm$ 9,0	0,02243	p<0,01
48 horas	61,0 $\pm$ 9,9	90,5 $\pm$ 8,2	0,05316	p<0,1
72 horas	83,0 $\pm$ 13,1	104,3 $\pm$ 14,4	0,09687	NS

Tabla 6.IX. Valores de la progesterona por cuerpo lúteo + folículo preovulatorio (potencial ovulatorio) en los animales que recibieron LHr (n=10) y hCG (n=10) (Valor de P: transf. logarítmica)  
Pot: potencial ovulatorio (CL+FP).  
NS: no significativo.





### 1.2.6. OTRAS RELACIONES DE LOS PARAMETROS HORMONALES Y BIOLÓGICOS

#### NIVELES DE ESTRADIOL MÁXIMOS EN RELACION A LA PRESENCIA DE FOLÍCULOS PREOVULATORIOS.

En el grupo tratado con LH, los niveles de estradiol alcanzados a las 72 horas por foliculo preovulatorio (FP) fue de  $2 \pm 0,6$  pg. En el grupo tratado con hCG el valor de esta expresión fue de  $10,3 \pm 5$  pg/FP; a pesar de la gran diferencia existente entre uno y otro grupo ésta no llegó a alcanzar significación estadística debido a la dispersión de los valores presentados por el grupo hCG (Tabla 6.X. Figura 6.14.).

	Grupo LHr pg/FP ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG pg/FP ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
Estradiol 72 h/FP	2,0 $\pm$ 0,6	10,3 $\pm$ 5,0	0,22208	NS

Tabla 6.X. Estradiol por folículo preovulatorio a las 72 horas de la administración de la LHr (n=9) o de la hCG (n=4).

FP: folículos preovulatorios.

NS: no significativo.

#### NIVELES DE ESTRADIOL MAXIMOS EN RELACION A LA PRESENCIA DE CUERPOS LUTEOS.

A las 72 horas de la administración de la LH, el estradiol por cuerpo lúteo (CL) fue mayor que a las 72 horas de la administración de la hCG (3,2  $\pm$  0,43 pg/CL vs 2,1  $\pm$  0,42 pg/CL respectivamente. La diferencia casi llegó a alcanzar significación estadística (p=0,096753) (Tabla 6.XI. Figura 6.14.).

	Grupo LHr pg/CL ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG pg/CL ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
Estradiol 72 h/CL	3,2 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,4	0,096753	<0,1*

Tabla 6.XI. Estradiol por cuerpo lúteo a las 72 horas de la administración de la LHr (n=9) o de la hCG (n=8).

CL: cuerpos lúteos.

\*: casi significativo.

#### NIVELES DE ESTRADIOL MAXIMOS Y POTENCIAL OVULATORIO.

Los niveles de estradiol a las 72 horas, en relación al número de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos (Pot), fue para la LH y para la hCG de 1,7  $\pm$  0,27 pg/Pot y de 2,1  $\pm$  0,32 pg/Pot



respectivamente, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los mismos

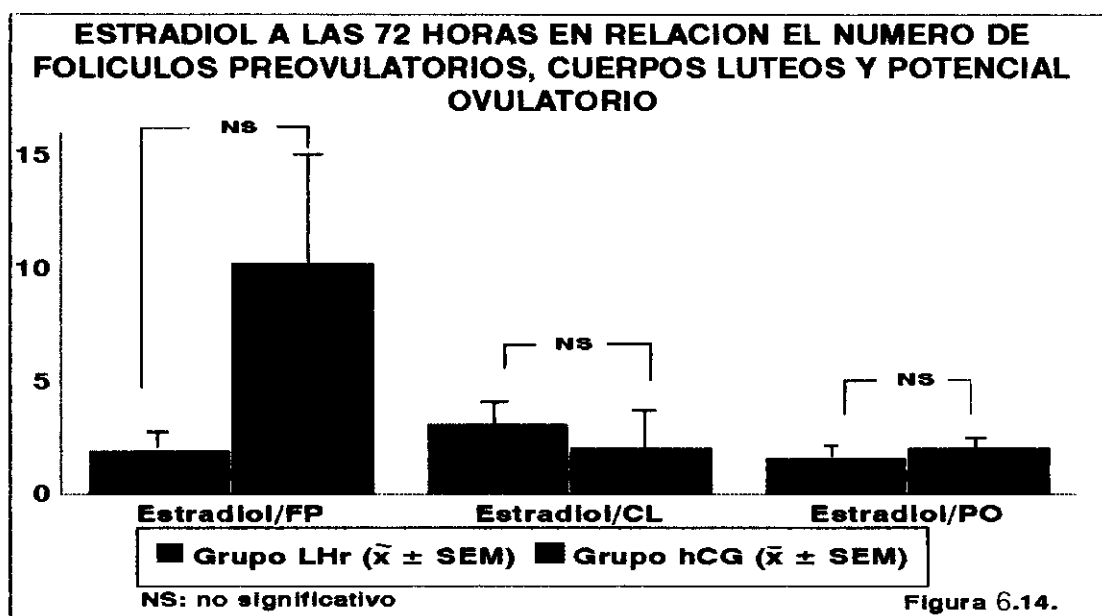
(Tabla 6.XII., Figura 6.14.)

	Grupo LHR pg/Pot ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG pg/Pot ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P
Estradiol 72 h/Pot	1,7 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3	0,31046 NS

Tabla 6.XII. Estradiol por cuerpo lúteo a las 72 horas de la administración de la LHR (n=10) o de la hCG (n=10).

Pot: cuerpos lúteos+folículos preovulatorios.

NS: no significativo.



### **1.3. ESTUDIOS DE IMPLANTACION A LOS 14 DIAS.**

En total se estudiaron 20 conejas a los 14 días, diez de las cuales recibieron LH recombinante y las 10 restantes hCG. Nueve de las conejas tratadas con LHR ovularon, mientras que las 10 tratadas con hCG alcanzaron la ovulación. Consecuentemente los cálculos y el análisis estadístico relativos a los embriones totales, embriones en desarrollo, embriones en regresión, porcentajes de implantación y pérdidas parciales a los 14 días, se realizaron sobre 9 animales del grupo tratado con LHR y sobre la totalidad (10) del grupo tratado con hCG.

#### **1.3.1. FOLICULOS CON OVULACION; CUERPOS LUTEOS.**

El grupo tratado con LH presentó una media de folículos con ovulación, determinados por la presencia de sus correspondientes cuerpos lúteos, de  $9,7 \pm 1,1$ .

En el grupo tratado con hCG la media de cuerpos lúteos fue de  $13,4 \pm 1,3$ .

El número de cuerpos lúteos en el grupo hCG resultó ser significativamente mayor que en el grupo LH ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.XIII. Figura 6.15.)

#### **1.3.2. EMBRIONES TOTALES.**

El número medio de embriones totales por coneja fue, en el grupo tratado con LHR de  $9,3 \pm 1$  embriones por animal.

En el grupo tratado con hCG la media de embriones totales fue de  $12 \pm 1,2$ .

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibió LHR y el que recibió hCG en relación a este parámetro (Tabla 6.XIII., Figura 6.15.)

### **1.3.3. EMBRIONES EN DESARROLLO.**

En el grupo de conejas que recibió LHR el número medio de embriones en desarrollo en los cuernos uterinos fue de  $8,4 \pm 1,1$ .

El grupo tratado con hCG, a los 14 días de la administración de la hormona, dió una media de  $11 \pm 1,1$  embriones en desarrollo.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 6.XIII., Figura 6.15.)

### **1.3.4. EMBRIONES EN REGRESION.**

El estudio de este parámetro en el grupo tratado con LHR puso de manifiesto la presencia de una media de  $0,9 \pm 0,3$  embriones en regresión a los 14 días de la ovulación.

En el grupo tratado con hCG la media de embriones en regresión fue de  $1 \pm 0,3$ .

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento

(Tabla 6.XIII. Figura 6.15).

Parámetro	Grupo LHR ( $\bar{x} \pm SEM$ )	Grupo hCG ( $\bar{x} \pm SEM$ )	P	
Cuerpos lúteos.	9,7 $\pm$ 1,1	13,4 $\pm$ 1,3	0,03978	p<0,05
Embriones en desarrollo.	8,4 $\pm$ 1,1	11,0 $\pm$ 1,1	0,11822	NS
Embriones en regresión	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3	0,78457	NS
Embriones totales	9,3 $\pm$ 1	12,0 $\pm$ 1,2	0,10724	NS
% de implantación.	96,9 $\pm$ 1,6	89,4 $\pm$ 2,5	0,02405	p<0,05
Pérdidas parciales a los 14 d.	10,2 $\pm$ 3,3	8,6 $\pm$ 2,5	0,70149	NS

Tabla 6.XIII. Resultados del estudio de implantación a los 14 días.  
NS: no significativo.

### 1.3.5. PORCENTAJE DE IMPLANTACION.

El porcentaje de implantación medio ( $(CL-(ED+ER))/CL$ ) en el grupo de conejas tratadas con LHR fue del 96,9  $\pm$  1,6 %.

En el grupo tratado con hCG el porcentaje de implantación medio fue del 89,4  $\pm$  2,5 %.

El porcentaje de implantación resultó ser significativamente más alto para el grupo tratado

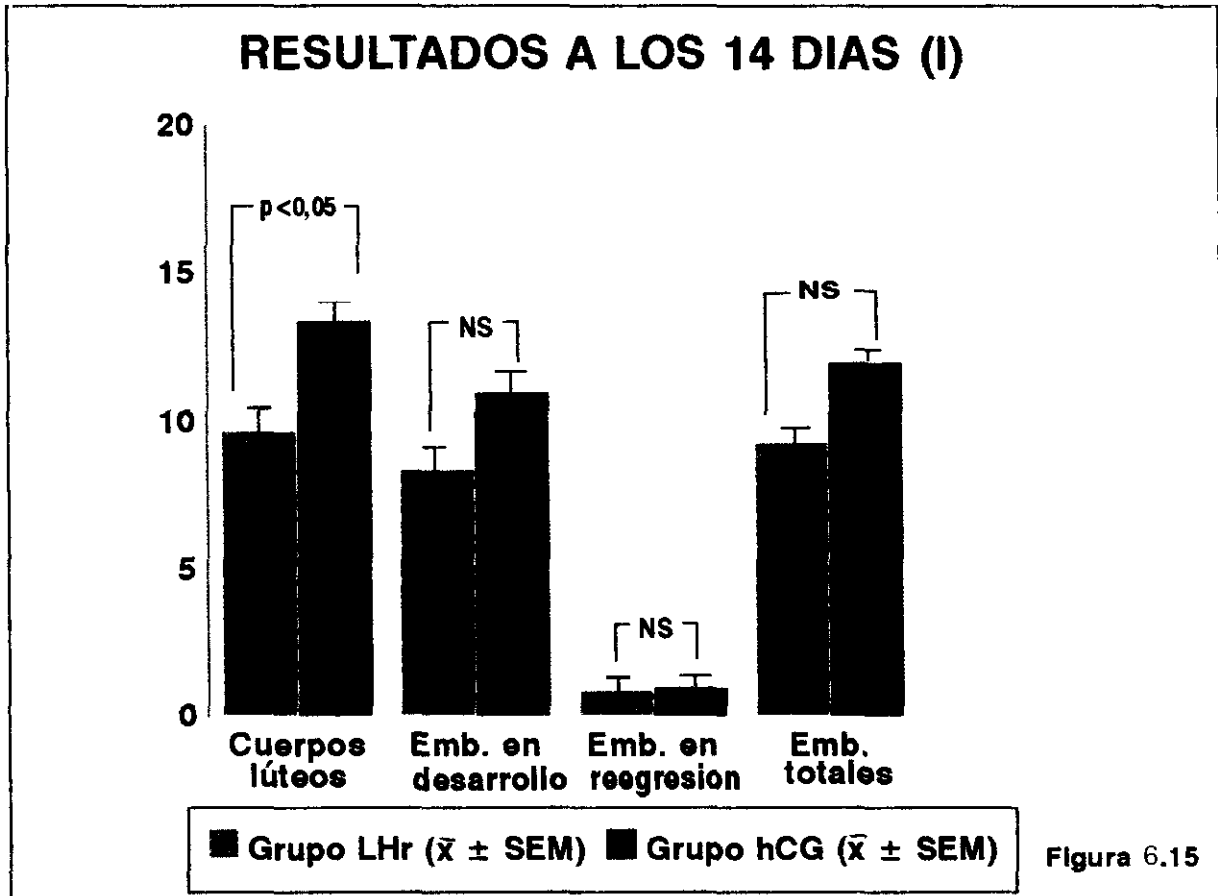
con LHr ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.XIII., Figura 6.16.)

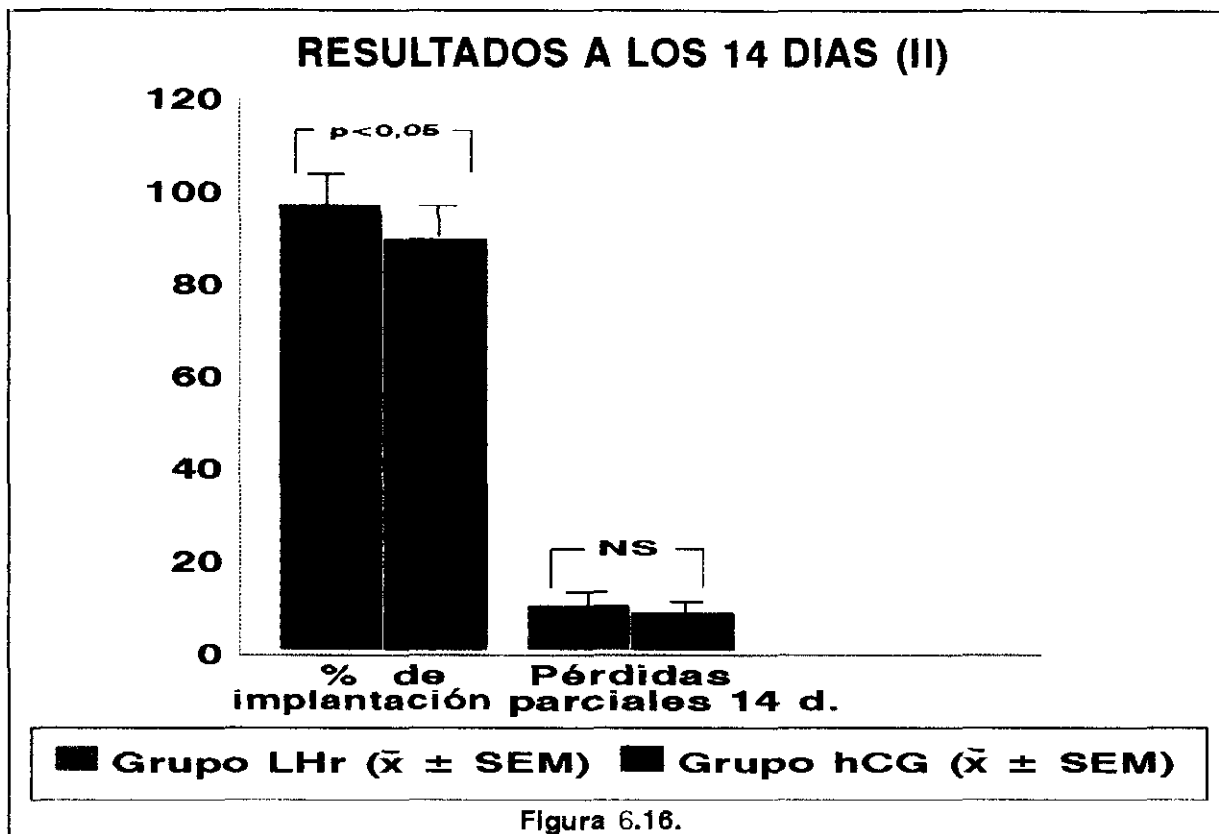
### 1.3.6. PERDIDAS PARCIALES A LOS 14 DIAS.

El porcentaje de pérdidas parciales ( $ER/[ED+ER]*100$ ) a los 14 días de la inducción de la ovulación con LHr fue del  $10,2 \pm 3,29 \%$ .

En el grupo tratado con hCG las pérdidas parciales fueron del  $8,6 \pm 2,5 \%$ .

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento (Tabla 6.XIII., Figura 6.16.).





#### 1.4. TASA DE OVULACION Y CUERPOS LUTEOS EN EL TOTAL DE LA EXPERIENCIA.

La tabla 5.XIV. refiere la tasa de ovulación y la media de cuerpos lúteos (folículos con ovulación) que se obtienen cuando se consideran conjuntamente los 20 animales que recibieron LH y los 20 que recibieron hCG, al adicionar los animales estudiados hasta las 72 horas y los estudiados hasta los 14 días.

El número de conejas que ovularon fue del 90 % en ambos grupos, LHR y hCG. El número de folículos con ovulación y transformación lútea fue mayor en el grupo que recibió hCG que en el que recibió LHR, siendo la diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

	Grupos LHr (n = 20)	Grupos hCG (n = 20)	P
Tasa de ovulación (%)	18/20 (90%)	18/20 (90%)	---
Cuerpos lúteos	8 ± 0,87	11,95 ± 1,14	0,00911 p<0,01

Tabla 6.XIV. Tasa de animales que ovularon con LH y con hCG y media de cuerpos lúteos (media ± error estandar medio) tras la administración de LH o hCG en el total de la experiencia.

## **2. ESTUDIO DE CORRELACIONES**



## **2.1. DATOS OVARICOS Y EMBRIONARIOS DE LAS HEMBRAS SACRIFICADAS A LAS 72 HORAS (Tabla 6.XV.).**

La tabla 6.XV. (matriz de correlaciones) refleja los resultados de las correlaciones calculadas para estos parámetros a las 72 horas postinducción de la ovulación.

### **2.1.1 CUERPOS LUTEOS (Tabla 6.XV.)**

#### **GRUPO LHR.**

El número de cuerpos lúteos presentó una correlación inversa significativa con el número de folículos hemorrágicos ( $r = -0,7255$ ), y directa con el número total de blastocistos ( $r = 0,98958$ ), la tasa de fecundación ( $r = 0,74565$ ), el número de embriones de grado 1 y 2 ( $r = 0,89797$ ) y el número de embriones de grado 3 y 4 ( $r = 0,69555$ ); en relación con los parámetros hormonales existió una correlación directa significativa con los niveles de progesterona a las 72 horas de la administración de la hormona.

#### **GRUPO hCG.**

El número de cuerpos lúteos se correlacionó inversamente y de forma estadísticamente significativa con el número de folículos preovulatorios ( $r = -0,81541$ ). Se puso de manifiesto la existencia de correlaciones directas con significación estadística con el número de folículos hemorrágicos ( $r = 0,78132$ ), el número de blastocistos totales ( $r = 0,99107$ ), el potencial ovulatorio (folículos preovulatorios + cuerpos lúteos) ( $r = 0,9194$ ), la tasa de fecundación ( $r = 0,89605$ ), el número de embriones grado 1 y 2 ( $r = 0,88595$ ), y el número de embriones grado 3 y 4 ( $r = 0,87912$ ). En cuanto a los parámetros hormonales existió una relación directa y

significativa entre el número de cuerpos lúteos y los valores de progesterona medidos a las 48 horas ( $r= 0,89084$ ) y a las 72 horas ( $r= 0,90807$ ).

Aunque el grado de correlación fue débil y sin significación estadística, el coeficiente de correlación existente entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones grado 5 (degenerados) fue mayor para el grupo tratado con hCG ( $r= 0,43771$ ) que para el grupo tratado con LH ( $r= 0,29006$ ).

Se produjo un cambio en el signo de la correlación existente con los niveles de estradiol medidos a las 24 horas, que en el grupo tratado con LH fue inversa ( $r= -0,34512$ ) y en el grupo en que se utilizó hCG fue directa ( $r= 0,30519$ ).

### 2.1.2. FOLICULOS HEMORRAGICOS (Tabla 6.XV.).

#### GRUPO LH.

Además de la correlación directa descrita con el número de cuerpos lúteos, se puso de manifiesto la existencia de correlaciones inversas, estadísticamente significativas, con el número de embriones de grados 1 y 2 ( $r= -0,73366$ ) y con el número de blastocistos totales ( $r= -0,65749$ ).

#### GRUPO hCG.

Además de la correlación directa existente con el número de cuerpos lúteos, al igual que sucedió en el grupo LH, existieron correlaciones inversas, estadísticamente significativas, con el número de blastocistos totales ( $r= -0,74213$ ) y con el número de embriones de grados 1 y 2 ( $r= -0,71972$ ). Adicionalmente se pusieron de manifiesto correlaciones inversas significativas

con el potencial ovulatorio ( $r = -0,64178$ ) y en cuanto a los parámetros hormonales, con la progesterona determinada a las 48 horas ( $r = -0,6523$ ) y a las 48 horas ( $r = -0,67997$ ). La correlación fue directa y estadísticamente significativa con el número de folículos preovulatorios ( $r = 0,74979$ ).

En relación al estradiol medido a las 24 horas, si bien no existió un cambio de signo, se encontró que el coeficiente de correlación fue inverso para el grupo hCG ( $r = -0,64459$ ), siendo en la práctica inexistente para el grupo LH ( $r = 0,02709$ )

### 2.1.3. FOLICULOS PEOVULATORIOS (Tabla 6.XV.)

#### GRUPO LH.

Existió un grado de correlación directa, que alcanzó significación, en relación al potencial ovulatorio ( $r = 0,69336$ ) e inversa con el estradiol preovulatorio (medido a las 0 horas) ( $r = -0,064797$ ).

#### GRUPO hCG.

Además de las correlaciones estadísticamente significativas ya descritas, inversa con el número de cuerpos lúteos y directa con la presencia de folículos hemorrágicos, el número de folículos preovulatorios se correlacionó de forma significativa con el número total de blastocistos ( $r = 0,76203$ ), así como con el número de embriones de los grados 1 y 2. En cuanto a los parámetros hormonales, el estudio de correlaciones mostró la existencia de correlaciones inversas, estadísticamente significativas con la progesterona medida a las 24 ( $r = -0,65537$ ), a las 48 ( $r = -0,70774$ ) y a las 72 horas ( $r = -0,67019$ ).

La correlación existente entre el número de folículos preovulatorios y el número total de blastocistos, que ya se ha citado fue directa en el grupo tratado con hCG, cambió de signo haciéndose inversa, aunque muy débilmente, en el grupo tratado con LH. Igualmente sucede en el caso de los embriones grado 1 y 2 para los que el grupo LH mostró una correlación inversa (-0,5977); para los embriones grados 3 y 4 y embriones degenerados (grado 5) es débilmente inversa para el grupo LH y para el grupo hCG (sin significación en ambos casos).

#### 2.1.4. NUMERO DE BLASTOCISTOS TOTALES (Tabla 6.XV.)

##### GRUPO LH.

Además de las correlaciones con significación estadística descritas, directa con el número de cuerpos lúteos e inversa con el número de folículos hemorrágicos, este parámetro se correlacionó de forma significativa con la tasa de fecundación ( $r= 0,82855$ ), y el número de embriones de grado 3 y 4 ( $r= 0,75339$ ). En cuanto a los parámetros hormonales se correlacionó, alcanzando significación estadística, con los niveles de progesterona a las 48 ( $r= 0,65286$ ) y a las 72 horas ( $r= 0,79328$ ).

##### GRUPO hCG.

Ya se han descrito las correlaciones existentes, directa con el número de cuerpos lúteos e inversa con el número de folículos hemorrágicos. Adicionalmente existió un alto grado de correlación con el potencial ovulatorio ( $r= 0,94252$ ), la tasa de fecundación ( $r= 0,95332$ ), los embriones de grado 1 y 2 ( $r= 0,86777$ ) y embriones de grados 3 y 4 ( $r= 0,92526$ ), correlaciones significativas todas ellas. En cuanto a los valores hormonales, el número de blastocistos totales se correlacionó de forma estadísticamente significativa, con la progesterona

determinada a las 48 horas ( $r= 0,88401$ ) así como a las 72 horas ( $r= 0,90007$ ).

Se observó un cambio del signo de la correlación, en el grupo tratado con hCG respecto al grupo tratado con LH, de la correlación existente con el número de folículos preovulatorios ( $r= -0,33291$  para LH y  $r= 0,76203$  para hCG), así como de los débiles coeficientes de correlación calculados entre los blastocistos totales y los niveles de estradiol a las 24 horas siendo  $r= -0,32859$  para LH y  $r= 0,28714$  para hCG.

#### **2.1.5. POTENCIAL OVULATORIO (NUMERO DE CUERPOS LUTEOS + NUMERO DE FOLICULOS PREOVULATORIOS) (Tabla 6.XV.)**

##### **GRUPO LH.**

Con la excepción del número de folículos preovulatorios, parámetro con el que se correlacionó de forma directa, no se puso de manifiesto la existencia de otras correlaciones que alcanzaran significación estadística.

##### **GRUPO hCG.**

Además de las correlaciones con significación descritas, con número de cuerpos lúteos, número de folículos hemorrágicos y número de blastocistos totales, el potencial ovulatorio se correlacionó directamente, de forma estadísticamente significativa, con la tasa de fecundación ( $r= 0,80422$ ), el número de embriones de grados 1 y 2 ( $r= 0,73494$ ), y embriones de grados 3 y 4 ( $r= 0,93088$ ). En cuanto a los parámetros hormonales el coeficiente de correlación alcanzó significación estadística con los niveles de progesterona a las 48 horas ( $r= 0,83172$ ) y a las 72 horas ( $r= 0,88262$ ).

Los débiles coeficientes de correlación existentes con los niveles de estradiol detectados a las 0, 24, 48 y 72 horas, cambian de signo de un grupo respecto al otro siendo negativos para el grupo tratado con hCG y positivos para el grupo tratado con LH.

#### 2.1.6. TASA DE FECUNDACION (Tabla 6.XV.).

##### GRUPO LH.

Junto a las correlaciones directas existentes con el número de cuerpos lúteos y el número de blastocistos totales, la tasa de fecundación se correlacionó de forma directa y estadísticamente significativa con la progesterona medida a las 72 horas ( $r= 0,88659$ ).

##### GRUPO hCG.

Además de las correlaciones detectadas como significativas, con el número de cuerpos lúteos, blastocistos totales y con el potencial ovulatorio (todas ellas directas), los embriones de grados 3 y 4 se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con la tasa de fecundación ( $r= 0,8709$ ).

Aún siendo bajos los coeficientes de correlación, existe un cambio en el signo de la correlación en los coeficientes existentes entre la tasa de fecundación y los embriones degenerados (grado 5), siendo  $r= -0,3291$  para hCG y  $r= 0,57885$  para LH.

### 2.1.7. EMBRIONES DE LOS GRADOS 1 Y 2 (Tabla 6.XV.)

#### GRUPO LH.

Salvo las correlaciones directas existentes con el número de cuerpos lúteos y con el número de blastocistos totales e inversa con el número de folículos hemorrágicos, no existió ningún otro parámetro de este tipo de embriones que se correlacionara de forma significativa.

#### GRUPO hCG.

Adicionalmente a la correlación directa existente con el número de cuerpos lúteos, el número de folículos preovulatorios, blastocistos totales y potencial ovulatorio, e inversa con el número de folículos hemorrágicos, existieron otras correlaciones estadísticamente significativas entre número de embriones de grados 1 y 2 y el número de embriones de grados 3 y 4 ( $r= 0,64972$ ), así como con la progesterona medida a las 48 y a las 72 horas ( $r= 0,80948$  y  $r= 0,79022$  respectivamente).

Se produjo un cambio en el sentido de la correlación de un grupo respecto al otro en las correlaciones existentes con el número de folículos preovulatorios por una parte ( $r= 0,83958$  para hCG y  $r= -0,5977$  para LH) y con el estradiol a las 0 horas ( $r= -0,56123$  para el grupo hCG y  $r= 0,5679$  para el grupo LH; no significativos) por otra. Existió un mayor grado de correlación entre el número de embriones de grados 1 y 2 y el estradiol a las 24 y 48 horas en el grupo LH que en el grupo hCG.

### **2.1.8. EMBRIONES DE LOS GRADOS 3 Y 4 (Tabla 6.XV.)**

#### **GRUPO LH.**

Junto a las correlaciones directas existentes con el número de cuerpos lúteos y de blastocistos totales, existieron correlaciones estadísticamente significativas con la progesterona a las 48 ( $r= 0,77689$ ) y 72 horas ( $r= 0,81792$ ).

#### **GRUPO hCG.**

Ya se describieron las correlaciones directas y significativas calculadas entre este parámetro y el número de cuerpos lúteos, blastocistos totales, potencial ovulatorio, tasa de fecundación y embriones de grados 1 y 2. Adicionalmente, se detectó la existencia de coeficientes que alcanzaron significación estadística para este parámetro y la progesterona a las 48 y 72 horas ( $r= 0,73576$  y  $r= 0,76627$  respectivamente), así como con el estradiol a las 48 horas ( $r= 0,69576$ ).

Se produjo un cambio del signo de los coeficientes de correlación, débiles y no significativos, para el estradiol medido a las 0 horas ( $r= -0,41368$  para la LH y  $r= 0,2742$  para la hCG).

### **2.1.9. EMBRIONES DEGENERADOS (GRADO 5) (Tabla 6.XV.)**

#### **GRUPO LH.**

No existieron correlaciones con significación estadística hacia ninguno de los parámetros estudiados.



### **GRUPO hCG.**

No se puso de manifiesto la existencia de ninguna correlación significativa con ninguno de los parámetros biológicos u hormonales estudiados.

Se detectó un cambio de signo de los coeficientes de correlación existentes entre los grupos, bajos y que no alcanzaron significación estadística en ningún caso, con el estradiol determinado a las 0, 24, 48 y 72 horas, existiendo coeficientes de correlación inversos en el grupo tratado con LH ( $r = -0,43957$  con el estradiol a las 0 horas;  $r = -0,4155$  con el estradiol a las 24 horas) y directos para el grupo que recibió hCG ( $r = 0,036759$  con el estradiol a las 0 horas;  $r = 0,42468$  con estradiol a las 24 horas;  $r = 0,030326$  con estradiol a las 48 horas).

## **2.2. DATOS HORMONALES HASTA LAS 72 HORAS POSTINDUCCION DE LA OVULACION**

(Tabla 6.XV.)

La tabla 6.XV. (matriz de correlaciones) expone los resultados obtenidos en el cálculo de las correlaciones de los datos hormonales.

### **2.2.1. PROGESTERONA (Tabla 6.XV.).**

#### **2.2.1.1. PROGESTERONA DETERMINADA A LAS 0 HORAS.**

**GRUPO LH:** se puso de manifiesto la existencia de una correlación directa, estadísticamente significativa con la progesterona medida a las 24 horas ( $r = 0,79454$ ).

**GRUPO hCG:** además de la correlación directa y significativa existente con el número de folículos hemorrágicos, no se puso de manifiesto la existencia de ninguna otra.

#### **2.2.1.2. PROGESTERONA DETERMINADA A LAS 24 HORAS.**

**GRUPO LH:** anteriormente se detalló la correlación directa existente con la progesterona a las 0 horas. No se halló ninguna otra correlación significativa.

**GRUPO hCG:** además de la correlación ya descrita, inversa, con el número de folículos preovulatorios ningún otro coeficiente alcanzó significación estadística.

#### **2.2.1.3. PROGESTERONA DETERMINADA A LAS 48 HORAS.**

**GRUPO LH:** adicionalmente a las correlaciones significativas detectadas con el número de blastocistos totales (directa) y con los embriones de grados 3 y 4 (directa), existieron correlaciones con significación estadística con la progesterona a las 72 horas ( $r= 0,81093$ ) así como con el estradiol a las 48 horas ( $r= 0,72971$ ).

**GRUPO hCG:** junto a las correlaciones significativas que mostró con algunos parámetros biológicos (directas para el número de cuerpos lúteos, blastocistos totales, potencial ovulatorio, y embriones grados 1-2 y 3-4 e inversas con el número de folículos hemorrágicos y folículos preovulatorios), existió un muy alto grado de correlación directa con la progesterona medida a las 72 horas ( $r= 0,99$ )

#### **2.2.1.4. PROGESTERONA DETERMINADA A LAS 72 HORAS.**

**GRUPO LH:** no se pusieron de manifiesto otras correlaciones significativas que no se hayan descrito (con número de cuerpos lúteos, blastocistos totales, tasa de fecundación, embriones de los grados 3 y 4 y progesterona medida a las 48 horas, todas ellas directas).

**GRUPO hCG:** no existieron correlaciones significativas aparte de las referidas con el número de cuerpos lúteos, blastocistos totales, potencial ovulatorio, embriones grados 1 y 2 y grados 3 y 4, todas ellas directas. y con el número de folículos hemorrágicos y folículos preovulatorios, estas dos últimas inversas.

#### **2.2.2. ESTRADIOL (Tabla 6.XV.).**

##### **2.2.2.1. ESTRADIOL A LAS 0 HORAS.**

**GRUPO LH:** excepto la descrita, inversa, con el número de folículos preovulatorios, ningún otro coeficiente alcanzó significación estadística.

**GRUPO hCG:** no existió ninguna correlación significativa.

Se produjo un cambio en el signo de los bajos coeficientes de correlación existentes con el potencial ovulatorio, que fue inverso para el grupo tratado con LH ( $r = -0,53666$ ) y débilmente directo en el grupo tratado con hCG ( $r = 0,10629$ ).

### **2.2.2.2. ESTRADIOL DETERMINADO A LAS 24 HORAS.**

**GRUPO LH: no existen correlaciones significativas con ningún otro parámetro.**

**GRUPO hCG: no se detectaron correlaciones con significación.**

Existe, de forma general, un cambio en el signo de los coeficientes de correlación entre los grupos, destacando entre ellos los relativos al número de cuerpos lúteos ( $r= 0,30519$  para el grupo hCG y  $r= -0,34512$  para el grupo LH), número de blastocistos totales ( $r= 0,28714$  para el grupo hCG y  $r= -0,32859$  para el grupo LH) y embriones degenerados (Grado 5) ( $r= 0,42468$  para el grupo hCG y  $r= -0,4155$  para el grupo LH). Ninguno de ellos alcanzó significación estadística.

### **2.2.2.3. ESTRADIOL DETERMINADO A LAS 48 HORAS.**

**GRUPO LH: además de la correlación directa existente con la progesterona medida a las 48 horas, no se detectó ningún coeficiente adicional significativo.**

**GRUPO hCG: no se detectó ninguna otra correlación significativa adicional a la directa existente con el número de embriones de grados 3 y 4.**

Se produjo un cambio en el signo de los débiles coeficientes existentes entre el estradiol medido a las 48 horas y el potencial ovulatorio ( $r= 0,45096$  para el grupo tratado con hCG y  $r= -0,20351$  para el grupo tratado con LH).

#### 2.2.2.4. ESTRADIOL DETERMINADO A LAS 72 HORAS.

GRUPO LH: no existieron correlaciones significativas.

GRUPO hCG: no existieron correlaciones significativas.

Se produjo un cambio en el signo de los coeficientes de correlación existentes en relación con el potencial ovulatorio, que fue positivo para el grupo tratado con hCG ( $r= 0,60758$ ), y negativo para el grupo LH ( $r= -0,11832$ ).

#### 2.2.3. CORRELACIONES ENTRE EL COCIENTE ESTRADIOL/PROGESTERONA Y LA CALIDAD EMBRIONARIA (Tabla 6.XIV.a)

El estudio de correlaciones puso de manifiesto la existencia de una relación inversa en el grupo hCG, estadísticamente significativa, entre el cociente estradiol/progesterona a las 72 horas postinducción de la ovulación y la presencia de embriones de buena calidad ( $r=-0,7283$ ). Este tipo de correlación no se evidenció en el grupo LHr ( $r=-0,3332$ ).

No se detectó la existencia de otras correlaciones significativas entre el cociente estradiol/progesterona y el grado de calidad embrionaria, en ninguno de los grupos LHr o hCG.

	hCG	LHr
Correlación entre calidad embrionaria y cociente $E_2/P_4$ (72 h)	-0,7283*	-0,3332

Tabla 6.XIV.a (\*  $p<0,05$ )

	LHr / 72 H.								
	CL	FH	FP	NB.TOT	CL+FP	TF	E1-2	E3-4	E5
CL					0,39417				0,29006
FH			-0,38894		-0,43535				0,02709
FP			0,13246						
NB TOT				-0,33291	0,44192				0,199
CL + FP						0,42641	0,10611	0,61254	0,4254
TF		0,094304	0,3057				0,49113	0,63603	0,57385
E1-2						0,43671		0,33518	0,17817
E3-4		-0,57982	-0,53639						0,16257
E5	0,43771	-0,64459	-0,584	0,34602	0,23621	-0,3291	0,39509	0,042117	
IP1	-0,47249		0,26801	-0,47827	-0,51408	-0,44563	0,2879	-0,32708	-0,051188
IP2	0,35287	-0,48426		0,27187	0,074645	-0,6979	0,36161	-0,53835	0,26591
IP3						0,59583			0,5087
IP4						0,59429			0,52128
E1	0,59245	-0,53359	-0,42739	0,57712	0,58255	0,17445	-0,56123	0,2742	0,36759
E2	0,30519	-0,08514	-0,50539	0,28714	0,10629	0,014042	-0,05731	-0,036287	0,42468
E3	0,53037	-0,46701	-0,48642	0,5646	0,45096	0,39016	0,25833		0,083168
E4	0,47161	-0,24891	-0,12849	0,51346	0,60758	0,53131	0,15226	0,61282	0,30326

hCG/72 H

	LHr / 72 H.							
	P1	P2	P3	P4	E1	E2	E3	E4
CL	-0,16862	0,19813	0,61862		0,14031	-0,34512	0,42229	0,45319
FH	-0,05693	-0,25032	-0,29815	-0,1514	-0,12793	0,4377	-0,30781	-0,10347
FP	0,026352	-0,11142	-0,24622	-0,20185		-0,33199	-0,53511	-0,47394
NB TOT	-0,19822	0,15685			0,051672	-0,32859	0,39724	0,47646
CL + FP	-0,1056	0,043826	0,23825	0,35947	-0,53666	-0,60144	-0,20351	-0,11832
TF	-0,038317	-0,027534	0,54515		-0,45633	-0,12591	0,17971	0,36574
E1-2	0,29947	0,17071	0,35537	0,47137	0,5697	0,056531	0,43306	0,51729
E3-4	-0,45678	-0,22141			-0,41368	0,132	0,241	0,2811
E5	0,28325	0,077706	0,15898	0,4605	-0,43957	-0,4155	-0,085979	-0,077421
P1			-0,12357	-0,14747	0,081808	0,14157	0,339	-0,018
P2	0,29153		0,16674	0,1166	0,41558	0,21676	0,598	0,232
IP3	-0,29089	0,38896			-0,02915	0,2406		0,24109
IP4	-0,36834	0,33454			-0,206	-0,016	0,44308	0,49378
E1	-0,54138	-0,027965	0,5606	0,612		0,40079	0,44399	0,1465
E2	-0,087162	-0,004109	0,1834	0,153	0,57973		0,548	0,1826
E3	-0,2398	-0,198	0,32029	0,32149	0,5375	0,4951		0,39282
E4	-0,5253	-0,304	0,48829	0,54282	0,5517	0,1246	0,35054	

hCG/72 H

**TABLA 6.XV** Matriz de correlaciones de los subgrupos estudiados a las 72 horas. Sobre la diagonal se encuentran los datos del grupo LHr, y debajo los correspondientes al grupo hCG. Sobre trama las correlaciones son significativas ( $p < 0,05$ )

P1: Progesterona a las 0 Hrs.  
P2: Progesterona a las 24 Hrs.  
P3: Progesterona a las 48 Hrs.  
P4: Progesterona a las 72 Hrs.  
E1: Estradiol a las 0 Hrs.  
E2: Estradiol a las 24 Hrs.  
E3: Estradiol a las 48 Hrs.  
E4: Estradiol a las 72 Hrs.

E12: Embriones grados 1 y 2.  
E34: Embriones grados 3 y 4.  
E5 : Embriones degenerados.  
ED : Embriones en desarrollo.  
ER : Embriones en regresión.  
E.TOT.: Embriones totales.  
% IMP.: Porcentaje de implantación.  
PP 14 DIAS: Pérdidas parciales postimplantatorias a las 14 días.

### **2.3. CORRELACIONES DE LOS DATOS HORMONALES Y LA LOCALIZACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES (Tabla 6.XVI.)**

La tabla 6.XVI muestra las correlaciones existentes entre los niveles de estradiol y progesterona y la presencia de ovocitos y embriones en oviductos o cuernos uterinos.

En ambos grupos, LHr y hCG, se puso de manifiesto la existencia de correlaciones significativas entre los niveles de progesterona a las 48 y 72 horas y la presencia de blastocistos en los oviductos. Estas correlaciones fueron más potentes en el grupo hCG ( $r=0,7258$  a las 48 horas y  $r=0,6601$  a las 72 horas en el grupo LHr;  $r=0,8146$  a las 48 horas y  $r=0,8153$  a las 72 horas en el grupo hCG).

Además, en el grupo LHr, los niveles de progesterona a las 72 horas se correlacionaron de forma inversa y significativa con la presencia de ovocitos en cuernos uterinos.

En el grupo hCG, por contra, los niveles de progesterona a las 24 horas se correlacionaron directa y significativamente con la presencia de ovocitos en cuernos uterinos.

No existieron otras correlaciones significativas entre los niveles esteroideos y la localización de ovocitos y embriones

**GRUPO LHr**

	E1	E2	E3	E4	P1	P2	P3	P4
<b>NBO</b>	-0,2808	-0,1350	0,2881	0,3393	-0,5343	-0,2081	0,7258	0,8601
<b>NBC</b>	0,4302	-0,2043	0,0823	0,1049	0,4740	0,4568	-0,1974	0,0052
<b>NOC</b>	0,5905	-0,0588	0,1053	-0,2213	0,2318	0,2537	-0,3363	-0,6428

**GRUPO hCG**

	E1	E2	E3	E4	P1	P2	P3	P4
<b>NBO</b>	0,3813	-0,0163	0,4683	0,4175	-0,2536	0,1361	0,8146	0,8152
<b>NBC</b>	0,2827	0,5186	0,1018	0,1079	-0,3488	0,2131	0,0101	0,0361
<b>NOC</b>	0,3163	0,2321	-0,0436	-0,1165	-0,1296	0,6780	0,3651	0,3792

**TABLA 6.XVI** Correlaciones entre los niveles esteroideos y la localización de Blastocistos y Ovocitos.  
En sombreado aparecen las correlaciones significativas ( $p < 0,05$ )

**NBO:** Número de Blastocistos en Oviductos.  
**NBC:** Número de Blastocistos en Cuernos.  
**NOC:** Número de Ovocitos en Cuernos.

**E1 ó P1:** Estradiol o Progesterona a las 0 horas.  
**E2 ó P2:** Estradiol o Progesterona a las 24 horas.  
**E3 ó P3:** Estradiol o Progesterona a las 48 horas.  
**E4 ó P4:** Estradiol o Progesterona a las 72 horas.



## **2.4. CORRELACIONES EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS A LOS 14 DIAS (Tabla 6.XVII.)**

La tabla 6.XVII. corresponde a la matriz de correlaciones de los parámetros estudiados a los 14 días.

### **2.4.1. NUMERO DE CUERPOS LUTEOS.**

**GRUPO LH:** se puso de manifiesto la existencia de una correlación directa, estadísticamente significativa y con elevados coeficientes de correlación, entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones en desarrollo ( $r= 0,96704$ ) así como con el número de embriones totales ( $0,99411$ ).

**GRUPO hCG:** de igual manera que en el grupo anterior, aunque con coeficientes de correlación discretamente más bajos, existió una correlación directa con el número de embriones en desarrollo ( $r= 0,92001$ ) y el de embriones totales ( $r= 0,97191$ ).

### **2.4.2. EMBRIONES EN DESARROLLO.**

**GRUPO LH:** además de la correlación directa descrita con el número de cuerpos lúteos, existió otra, estadísticamente significativa, con el número de embriones totales ( $r= 0,98173$ ).

**GRUPO hCG:** además de la correlación directa descrita con el número de cuerpos lúteos, se puso de manifiesto la existencia de un alto grado de correlación con el número de embriones

**totales ( $r= 0,9677$ ).**

#### **2.4.3. EMBRIONES EN REGRESION.**

**GRUPO LH: existió una correlación que alcanzó significación estadística con el número de pérdidas parciales a los 14 días ( $r= 0,95256$ ).**

**GRUPO hCG: al igual que en el grupo LH se correlacionó bien con las pérdidas parciales producidas hasta los 14 días ( $r= 0,89187$ ).**

**Estas correlaciones son consecuencia de la aplicación de la fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de pérdidas parciales.**

#### **2.4.4. EMBRIONES TOTALES.**

**GRUPO LH: no se produjeron otras correlaciones significativas que no fueran las detalladas anteriormente (directas con embriones en desarrollo y número de cuerpos lúteos).**

**GRUPO hCG: salvo las descritas, directas, con el número de cuerpos lúteos y embriones en desarrollo, el resto careció de significación.**

#### **2.4.5. PORCENTAJE DE IMPLANTACION**

**No se puso de manifiesto la existencia de correlaciones significativas entre este parámetro y ninguno de los restantes.**

**Existió un cambio en el signo del coeficiente de correlación relativo a las pérdidas parciales, siendo directo para el grupo hCG ( $r= 0,59472$ ) e inverso para el grupo LH ( $r= -0,27245$ ).**

#### **2.4.6. PERDIDAS PARCIALES A LOS 14 DIAS.**

**GRUPO LH: salvo la correlación existente, estadísticamente significativa, ya descrita con el número de embriones en regresión, no se detectó ninguna más con significación.**

**GRUPO hCG: únicamente existió la anteriormente descrita, con el número de embriones en regresión.**

## LHr / 14 DIAS

	CL	ED	ER	E TOT	% IMP	PP 14 DIAS
CL		0,92733	0,27542	0,99411	-0,25068	-0,16846
ED	0,92001		0,04191	0,99173	0,00356	-0,44154
ER	0,35306	0,033408		0,23126	-0,41229	0,95255
E TOT	0,97181	0,25027	0,28808		-0,10087	-0,21766
% IMP	0,087377	0,40473	-0,29826	0,31141		-0,27245
PP 14 DIAS	0,011524	-0,34714	0,30187	-0,10422	0,59472	

## HCG / 14 DIAS

**TABLA 6.XVII** Matriz de correlaciones de los subgrupos estudiados a los 14 días. Sobre la diagonal los datos corresponden al grupo LI y por debajo de ella al grupo hCG.

CL : Cuerpos Lúteos.

ED : Embriones en desarrollo.

ER: Embriones en regresión.

E. TOT.: Embriones Totales

% IMP.: Porcentaje de Implantación.

PP 14 días : Pérdidas parciales postimplantatorias a los 14 días.

En sombreado aparecen los coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ )

## **2.5. CORRELACIONES ENTRE LOS SUBGRUPOS ESTUDIADOS A LAS 72 HORAS Y LOS ESTUDIADOS A LOS 14 DIAS (Tabla 6.XVIII.).**

Con el fin de conocer si existían relaciones entre los niveles de esteroides máximos y los resultados obtenidos en cuanto a implantación y pérdidas precoces postimplantatorias, se procedió a realizar el estudio de correlaciones entre el estradiol y la progesterona medidos a las 48 y 72 horas de la administración de la LHr o de la hCG y el número de embriones en desarrollo, embriones en regresión, embriones totales, porcentaje de implantación y pérdidas parciales a los 14 días.

Igualmente se estudió la existencia de posibles correlaciones entre los embriones de grados 1-2, 3-4 y degenerados (grado 5) obtenidos en el estudio a las 72 horas con los parámetros referidos anteriormente estudiados a los 14 días.

La tabla 6.XVIII. expresa los coeficientes de correlación existentes entre los parámetros objeto de estudio en este apartado.

### **2.5.1. PROGESTERONA A LAS 48 HORAS.**

En ninguno de los grupos (LH o hCG) existieron correlaciones estadísticamente significativas.

### **2.5.2. PROGESTERONA A LAS 72 HORAS.**

*En ninguno de los grupos (LH o hCG) existieron correlaciones estadísticamente significativas.*

### **2.5.3. ESTRADIOL A LAS 48 HORAS.**

**GRUPO LH:** no existieron correlaciones significativas. El coeficiente de correlación existente entre el porcentaje de implantación y el estradiol medido a las 48 horas fue  $r = -0,5033$ .

**GRUPO hCG:** existió una relación inversa estadísticamente significativa entre el estradiol medido a las 48 horas y el porcentaje de implantación ( $r = -0,75376$ )

### **2.5.4. ESTRADIOL A LAS 72 HORAS.**

**GRUPO LHR:** existió una relación inversa estadísticamente significativa entre el estradiol medido a las 72 horas y el porcentaje de implantación ( $r = -0,92738$ ).

**GRUPO hCG:** no existió ninguna correlación estadísticamente significativa.

### **2.5.5. EMBRIONES DE LOS GRADOS 1 Y 2.**

**GRUPO LHR:** no existieron correlaciones que alcanzaran significación estadística.

**GRUPO hCG:** existió una correlación inversa estadísticamente significativa con el porcentaje de implantación ( $r = -0,71755$ ).

### **2.5.6. EMBRIONES DE LOS GRADOS 3 Y 4.**

**GRUPO LHr: no existieron correlaciones que alcanzaran significación estadística.**

**GRUPO hCG: existió una correlación inversa estadísticamente significativa con el porcentaje de implantación ( $r = -0,6966$ ), y directa con las pérdidas parciales a los 14 días ( $r = 0,72557$ ).**

### **2.5.7. EMBRIONES DEGENERADOS (GRADO 5)**

**En ninguno de los grupos (LH o hCG) existieron correlaciones estadísticamente significativas.**

	ED	ER	E.TOT	% IMPL.	PP 14D
P3	0,21154	-0,10822	0,18537	-0,17436	-0,29286
P4	0,15657	0,1739	0,18558	-0,41717	-0,071947
E3	0,14438	-0,02597	0,13564	-0,5033	-0,089367
E4	0,26599	0,43363	0,34159	-0,52738	0,22024
E12	0,20532	-0,058321	0,18882	-0,62835	-0,34208
E34	0,08326	-0,16724	0,04922	-0,14428	-0,32555
E5	-0,12804	-0,05455	-0,13507	0,16587	-0,15227

GRUPO LHR

	ED	ER	E.TOT	% IMP	PP 14D
P3	-0,051898	0,47237	0,066	-0,51722	0,50437
P4	0,011074	0,50787	0,11263	-0,48733	0,50798
E3	-0,37177	-0,07909	-0,36545	-0,73374	0,26852
E4	0,13	0,19724	0,16885	0,033978	0,141
E12	0,029693	0,55604	0,16226	-0,11734	0,62468
E34	-0,2597	0,53636	-0,11207	-0,53388	0,72537
E5	0,36848	-0,26186	0,28831	-0,09957	-0,41574

GRUPO hCG

TABLA 6.XVIII Correlaciones entre subgrupos 72 horas y 14 días

P3: Progesterona a las 48 h.

P4: Progesterona a las 72 h.

E3: Estradiol a las 48 h.

E4: Estradiol a las 72 h.

E12: Embriones grados 1 y 2

E34: Embriones grados 3 y 4

E5: Embriones degenerados.

ED: Embriones en desarrollo.

ER: Embriones en regresión

E.TOT: Embriones totales.

% IMP.: Porcentaje de implantación.

PP 14 DIAS: Pérdidas parciales postimplantatorias a los 14 días.

En sombreado aparecen las correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )



## **7. DISCUSSION**

**En nuestro trabajo nos proponíamos alcanzar los siguientes objetivos:**

**1. Establecer si la administración de LH recombinante es capaz de inducir la ovulación y la maduración final del ovocito en conejas en ausencia de la descarga endógena refleja de LH que se produce con la monta de la coneja por el macho.**

**2. Determinar, en la etapa inmediatamente posterior, la calidad de los embriones obtenidos, tras la práctica de una inseminación, comparando los datos obtenidos con la administración convencional de hCG.**

**3. Estudiar, finalmente, la viabilidad de los cigotos obtenidos, en lo que se refiere a la tasa de implantación y a la tasa de pérdidas precoces postimplantatorias, comparativamente con la hCG.**

**Dado que la coneja no presenta ciclos ováricos que sigan esquemas regulares (144, 145), tal y como ya se ha detallado en el apartado de antecedentes, resulta imperativo estimular el desarrollo folicular previamente a la inducción final de la ovulación con el agente luteinizante. Además la presencia de un desarrollo multifolicular simula de forma más adecuada las condiciones imperantes cuando se practican técnicas de superovulación previas a la aplicación de técnicas de reproducción asistida en el humano.**

**En nuestro experimento optamos por la administración intramuscular única de 25 UI de PMSG, como agente inductor del desarrollo multifolicular, durante la fase de estro del animal. Esta dosis, con la que hemos trabajado con anterioridad (42, 96, 97), nos ha proporcionado buenos**

resultados, y previamente ya había sido recomendada por otros autores (53).

Hasta el presente nuestro grupo no había desarrollado ningún experimento con LH recombinante. Tampoco existe ninguna referencia bibliográfica sobre los efectos de la LH humana recombinante sobre la ovulación, calidad embrionaria a las 48 horas y sobre las tasas de implantación y de pérdidas parciales postimplantatorias en la coneja.

Por contra si que existía experiencia previa en relación al uso de LH humana pura de origen urinario (42, 96, 97) y sus efectos sobre la ovulación, calidad ovocitaria y embrionaria. Sin embargo no nos resultaba conocido hasta que punto, los resultados obtenidos, estaban o no influenciados por la monta de la hembra por el macho, al tratarse la coneja de un animal con *descarga ovulatoria de LH inducida por el coito* (54, 130), aunque inferíamos que esta influencia existía. Por otra parte la LH urinaria, como sucede con otros extractos gonadotrópicos de uso común, posee un relativamente elevado contenido de proteínas no LH cuya naturaleza desconocemos.

Inicialmente nos habíamos planteado la realización del presente estudio mediante el desarrollo de un diseño experimental que incluía tres grupos de hembras: un primer grupo en el que únicamente se practicaba la estimulación folicular mediante la administración de PMSG seguida de monta por el macho (grupo control) y dos grupos adicionales que contemplaban la administración de hCG o de LH recombinante, respectivamente. Este diseño, pensábamos, permitiría conocer los efectos atribuibles a la descarga endógena de LH que se produce en la coneja consecutiva a la monta (145) y consecuentemente, una mejor aproximación a los efectos específicos determinados por la LH recombinante en comparación con la hCG.

Sin embargo, la posibilidad de practicar inseminaciones artificiales, evitando la monta por el macho, abría nuevas posibilidades: de una parte permitía simplificar el estudio, ya que podíamos prescindir del grupo control con PMSG + monta; por otra parte podíamos analizar de forma mucho más precisa, específica y directa la acción de la LH recombinante humana en la coneja. En consecuencia optamos por esta segunda posibilidad.

En un estudio previo (42), se comparó el efecto de la LH pura urinaria sobre la tasa de ovulación, calidad ovocitaria y calidad embrionaria a las 24 y 48 horas, respectivamente, con el obtenido con la hCG. En él se puso de manifiesto un efecto superior de la LH urinaria, al obtenerse una mejor calidad morfológica de ovocitos y embriones. Ya hemos mencionado que en este estudio la inseminación de la hembra se realizó mediante coito natural, y los resultados podían verse alterados por el efecto aditivo o por las interferencias causadas por la LH endógena generada reflejamente por dicha maniobra.

Resulta oportuno, en esta primera parte de la discusión de resultados, tratar acerca de la validez de nuestro diseño. La respuesta esteroidogénica del ovario al estímulo de las hormonas con acción luteotropa puede constituir un indicador adecuado de los posibles efectos derivados de la combinación monta + administración exógena de LH o hCG. El diseño del estudio de González Santana (42) incluía la determinación de los valores de estradiol y progesterona a las 24 y 48 horas de la administración de la hCG o la LH pura urinaria (y de la monta correspondiente por el macho). La disponibilidad de estos datos posibilita la realización de comparaciones entre los niveles de estos dos esteroides, hallados en el estudio de referencia y los obtenidos en el presente estudio en los mismos tiempos post-inducción de la ovulación.

El estudio comparativo puso de manifiesto que, los niveles de estradiol y progesterona, eran de manera sistemática, significativamente mayores cuando se administraba la hormona desencadenante de la ovulación y simultáneamente se realizaba la monta por el macho. Así la administración de LH pura urinaria con monta se veía seguida de unos niveles medios de estradiol a las 48 horas de  $30,8 \pm 7,8$  pg/ml ( $\bar{x} \pm SEM$ ) mientras que la administración de LH recombinante con inseminación artificial evocaba una respuesta de estradiol a las 48 horas de  $11,1 \pm 2$  pg/ml ( $p < 0,05$ ). En relación a la progesterona el fenómeno se repetía, siendo sus valores a las 48 horas de la administración de la LH urinaria y monta de  $2739 \pm 194$  pg/ml mientras que, en los animales que recibieron LH recombinante seguida de inseminación, se alcanzaron únicamente  $902 \pm 150$  pg/ml ( $p < 0,001$ ).

Podría argumentarse, en base a los datos hasta aquí expuestos, que la distinta respuesta esteroideogénica observada podría atribuirse a la distinta calidad de la LH utilizada en uno y otro experimento: una de origen urinario, acompañada de otros péptidos no LH; otra obtenida utilizando técnicas de ADN recombinante y desprovista virtualmente de cualquier otra sustancia no LH (especificaciones IRCS para la LH humana recombinante).

La comparación de los niveles de estradiol y progesterona cuando se administró la misma dosis de hCG, acompañada de monta o de inseminación, ayuda a despejar dudas al respecto. Así los niveles de estradiol a las 48 horas de la administración de hCG seguida de monta fueron de  $38,6 \pm 5,3$  pg/ml, siendo de  $10,1 \pm 2$  pg/ml en nuestro estudio cuando se administró la misma dosis de hCG, pero seguida de inseminación. El fenómeno se repitió para la progesterona.

La tabla que sigue refleja los niveles medios de estradiol y progesterona a las 24 y 48 horas

postinducción de la ovulación, en el estudio realizado con LH urinaria y hCG seguidas de monta por el macho (González Santana), y en la presente investigación, utilizando LH recombinante y hCG seguidas de inseminación artificial.

	LHu + Monta* (pg/ml)	LHr + Inseminación (pg/ml)	
P <sub>4</sub> a las 24 horas	994 ± 82	272 ± 42	p<0,001
P <sub>4</sub> a las 48 horas	2739 ± 194	902 ± 150	p<0,001
E <sub>2</sub> a las 24 horas	29,2 ± 1,7	9,5 ± 1,7	p<0,01
E <sub>2</sub> a las 48 horas	30,8 ± 7,8	11,1 ± 2,0	p<0,05

	hCG + Monta* (pg/ml)	hCG + Inseminación (pg/ml)	
P <sub>4</sub> a las 24 horas	1340 ± 76	537 ± 95	p<0,001
P <sub>4</sub> a las 48 horas	2840 ± 261	1131 ± 146	p<0,001
E <sub>2</sub> a las 24 horas	34,8 ± 6,4	11,8 ± 1,3	p<0,001
E <sub>2</sub> a las 48 horas	38,6 ± 5,2	10,1 ± 1,9	p<0,001

Tabla 6.I. según datos obtenidos por González Santana (42)

Nuestra reflexión inicial parece en consecuencia correcta, por cuanto hemos podido demostrar la existencia de un efecto aditivo en la coneja, cuando se administra la substancia desencadenante de la ovulación y después, se procede a la monta por el macho, debido a la liberación de LH endógena como respuesta inmediata. Este efecto aditivo, entre otros, se manifestaría a través de una potenciación de la función esteroidogénica del ovario.

Queda, por lo tanto, de esta forma plenamente justificado el diseño utilizado para el presente

estudio, puesto que hemos evitado el fenómeno aditivo no deseable descrito, lo que nos permite valorar más objetivamente los efectos de la LH recombinante frente a la hCG.

En cuanto a la dosis de hCG y de Lhr administradas, hemos optado por 50 UI para ambas, basándonos en los estudios previos realizados por Bonsell-Helmreich (9). Aunque estos estudios no hacen referencia a la dosificación más idónea de la Lhr, refiriéndose únicamente a la hCG, son varias las razones que nos inclinaron a utilizar la misma dosis de ambas sustancias. En primer lugar el receptor al que se fijan para ejercer su acción es el mismo (127); en segundo lugar la equivalencia en cuanto a bioactividad, ya que se trata de unidades de actividad biológica, cuya valoración se establece mediante la realización de un biosensayo con células de Leydig en el que se valora la producción de testosterona correspondiente a distintas concentraciones de la sustancia sometida a estudio (149); en tercer lugar se ha publicado que, cuando se realizan estudios de inhibición de la unión al receptor, no existen diferencias entre la LH recombinante y la hCG, en cuanto a su grado de unión al receptor de membrana presente en células lúteas (139). Por último, la experiencia previa existente con estas dosis y su eficacia ovuladora, constituye una razón adicional (42, 92, 97). Así que únicamente podría haber variaciones en función de la vida media de la hormona (125, 139, 159), o de su período de fijación y activación al receptor, que son más prolongados para la hCG que para la LH (19).

El estudio de los ovarios del total de las 40 hembras incluidas en el estudio evidenció que el porcentaje de animales que ovuló en cada uno de los grupos, Lhr o hCG, fue idéntica, del 90 %, en ambos casos (18 hembras sobre un total de 20 para cada hormona). Sin embargo la tasa de ovulación media (número de folículos luteinizados con cicatriz ovulatoria) resultó significativamente inferior en el grupo de hembras que recibieron Lhr, siendo en este caso de  $8 \pm 0,9$  cuerpos lúteos frente a  $13 \pm 0,8$  en el grupo que recibió hCG.

En términos de ovulación, nuestros resultados son sensiblemente inferiores a los hallados por Molina y cols. (96) cuando compararon los efectos de la LH pura urinaria con los de la hCG, si bien es cierto que los resultados de su trabajo coinciden con los nuestros en que el número de cuerpos lúteos fue superior tras la administración de hCG que tras la de LH urinaria, aunque esta diferencia no fue significativa en su trabajo (15,2 con LH urinaria y 17,3 con hCG), probablemente debido a que en su trabajo el número de casos es inferior al nuestro.

Por otra parte el mayor número de cuerpos lúteos obtenidos en la experiencia de Molina (96), en comparación con nuestro experimento, podría deberse a una mayor actividad luteotrófica ovulatoria, tanto en las hembras que recibieron LH urinaria como en las que recibieron hCG, como consecuencia de la descarga adicional endógena de LH consecutiva a la monta por el macho y que hemos referido anteriormente al justificar la validez de nuestros argumentos para utilizar inseminación en lugar de monta por el macho, con lo cual se hacía difícil asignar la verdadera efectividad biológica de cada preparación (LH o hCG).

Resulta de interés observar que, a las 72 horas, tan solo 4 hembras del grupo que recibió hCG, frente a 9 del grupo LHR, presentaban algún folículo preovulatorio. Además, mientras que en el grupo hCG la media de folículos preovulatorios fue de 1,8, en el grupo LHR fue de 8,2, siendo esta diferencia altamente significativa. Dado que la suma de cuerpos lúteos y folículos preovulatorios (potencial ovulatorio) fue semejante en ambos grupos, así como la presencia de folículos hemorrágicos, cabe pensar que el efecto de la hCG resultó extremadamente más potente, o si se quiere más eficiente, que el de la LHR en términos de poder ovulatorio, a juzgar por las importantes diferencias observadas en relación a cuerpos lúteos y folículos preovulatorios en uno y otro grupo, probablemente como consecuencia de su vida más larga.



Además, en el grupo hCG, encontramos la existencia de una potente relación inversa entre el número de cuerpos lúteos y el número de folículos preovulatorios ( $r=-0,81541$ ), que no se manifiesta en el grupo LHr, dato que también apoya la idea de que la LH hace ovular un mayor número de folículos que la LHr, a expensas de los folículos preovulatorios disponibles durante el periodo de 72 horas transcurrido desde la administración de la hormona, hasta el momento de estudio. En el grupo hCG existió una relación directa significativa entre el número de cuerpos lúteos y el número de folículos hemorrágicos ( $r=0,78132$ ), mientras que en el grupo LHr se transformó en negativa, siendo también significativa ( $r=-0,72553$ ). En consecuencia cabe pensar que la producción de folículos hemorrágicos es un fenómeno que se encuentra más ligado a las características biológicas de la hCG.

Por otra parte el número de cuerpos lúteos que se producen en el ciclo ovulatorio natural de la coneja es aproximadamente de 8 (8, 13, 144, 145), similar al obtenido en el grupo que recibió LHr, e inferior al que recibió hCG y todo ello tras un tratamiento superovulador previo, en el que el potencial ovulatorio, determinado a las 72 horas de la inducción de la ovulación, no fue significativamente distinto entre los dos grupos, LHr y hCG. Este hecho abogaría por un mecanismo ovulatorio más fisiológico de la LHr frente a la hCG.

En el ciclo natural de la coneja el porcentaje de ovulación es prácticamente del 100 % (144). Nuestro estudio se desarrolla en condiciones de superovulación. Por lo tanto el número de folículos estimulados en el ciclo evaluado, cabe suponer, es superior al de un ciclo natural. En el presente estudio, a las 72 horas, existe un remanente de folículos preovulatorios equivalente al 14,6 % en el grupo hCG (porcentaje calculado utilizando el cociente folículos preovulatorios/potencial ovulatorio), pero que adquiere especial relevancia en el grupo LHr en donde alcanza el 52,9 %.

Es probable que en un ciclo natural, con el desarrollo sincrónico de una oleada de folículos, éstos se encuentren en su totalidad, o en su práctica totalidad, con un grado de madurez y desarrollo (dotación de receptores para la LH, entre otros) idóneos para ovular y sufrir la transformación lútea (43, 44), lo que justificaría la ocurrencia de porcentajes de ovulación del 100 %. Sin embargo, en un ciclo estimulado, en el que utilizando medios farmacológicos se estimula al ovario a producir más folículos, no resulta probable que se produzca esta sincronía por cuanto, por una parte, ciertos folículos pueden ser rescatados de la evolución hacia la atresia, bajo los efectos de la hormona folículoestimulante administrada exógenamente (56), folículos que, de otra forma, no alcanzarían el estadio preovulatorio. Por otra parte, folículos antrales pequeños, ya dotados de capacidad para responder a la FSH, pueden ver acelerado su desarrollo, al encontrarse capacitados para responder a la FSH y simultáneamente, superarse su umbral de respuesta con la administración a dosis farmacológicas del preparado folículoestimulante (PMSG), pudiendo alcanzar, también, la fase de folículo preovulatorio aunque, probablemente, con un cierto retraso respecto a los folículos pertenecientes al ciclo natural espontáneo (3). En el ciclo natural humano, en la cohorte de folículos en desarrollo, existen folículos con un volumen que varía desde 3 a 30 ml en el momento de la descarga de LH (71). Así, en los ciclos estimulados, en el momento de la administración de la hCG existe una mayor presencia de folículos que no han madurado completamente y carecen en ese momento del número adecuado de receptores para la LH (55, 112).

Muy recientemente Fisher y cols (31) han realizado un estudio, en mujeres sometidas a tratamiento estimulador ovárico, en el que han tratado de definir el intervalo transcurrido entre la administración de la hCG, y el momento de la ruptura folicular y de inicio de los procesos endocrinológicos asociados con la ovulación. El período de seguimiento se prolongó

hasta las 48 horas post-hCG. Entre sus hallazgos cabe destacar que la ovulación se produjo dentro de un amplio rango de tiempo tras la administración de la hCG. Este rango, que se iniciaba antes de las 36 horas de su administración se prolongaba, por un tiempo que los autores no pudieron determinar debido al diseño de su estudio, mas allá de las 48 horas. Los autores consideran que la sensibilidad de los folículos a la hCG es distinta entre ellos, bien en función de su dotación de receptores para LH, o bien porque existe una discordancia entre su tamaño y su sensibilidad a la hCG. En cualquier caso, resulta interesante que, más allá de las 48 horas más de un 10 % de folículos, en ese momento preovulatorios, todavía no habían ovulado. Una posibilidad considerada en este estudio por los autores es que la ovulación tuviera lugar fuera del período de observación (31).

Hay que tener presente que cuando, según nuestro diseño, se administra la PMSG, la fase de reclutamiento folicular espontáneo del ciclo natural de la hembra ya ha transcurrido, existiendo unos elevados niveles de estradiol, que se manifiestan por el enrojecimiento vulvar y que, por lo tanto, se ha producido la selección de algunos folículos dominantes correspondientes al ciclo natural sobre el que se ha superpuesto la superovulación (43, 55, 78, 113)

Llegados a este punto debemos detenernos y volver a los objetivos perseguidos cuando diseñamos el presente estudio. Un hecho crítico que tuvimos en cuenta cuando elaboramos las hipótesis de este trabajo, es que la vida media bioactiva de la LH recombinante es de 84 minutos (139), mientras que la de la hCG es superior a las 24 horas, más exactamente de 1482 minutos (139, 159). En este hecho diferencial puede residir un mayor efecto luteotrope de la hCG que explicaría el número significativamente mayor de cuerpos lúteos, y significativamente menor de folículos preovulatorios, producidos en las hembras que recibieron esta hormona en

**comparación con las que recibieron LH.**

**En efecto, la hCG por su mayor permanencia en plasma de forma bioactiva, permanencia que dependería, no sólo de los niveles máximos alcanzados en función de la dosis administrada, sino también de su vida media, sería capaz de inducir a la ovulación a folículos que, en el momento de su administración, aún no estaban suficientemente maduros, pero que a lo largo de las 72 horas transcurridas desde su administración hasta el momento del sacrificio y estudio ovárico podían haber alcanzado niveles suficientes de maduración. Por contra la LHR, a pesar de haber alcanzado semejantes niveles máximos, desaparecería mucho más rápidamente, en cuestión de pocas horas, resultando su efecto ovulatorio y luteotrópico mucho más limitado.**

**Junto al hecho anterior, el período de fijación-activación del receptor de la hCG es mayor que el de la LH (19).**

**La dosis de LH administrada constituye un factor adicional importante que hay que tener presente y que puede condicionar la respuesta obtenida. Este factor, que en nuestro estudio no puede ser evaluado, debe ser objeto de nuevos estudios.**

**Aunque muchos de los aspectos etiopatogénicos de la hiperestimulación ovárica no resultan conocidos, se sabe que este cuadro se relaciona estrechamente con la administración exógena de hCG o con la instauración de un embarazo y la simultánea liberación de hCG endógena (83, 100, 133). Por otra parte la literatura refleja que una forma efectiva de no desencadenar un cuadro severo de hiperestimulación consiste en evitar la administración de hCG cuando concurren determinadas circunstancias (32, 39, 141) como son la presencia de elevados niveles**

de estradiol, un incremento excesivamente acelerado de los niveles de este esteroide, o excesivo desarrollo folicular con numerosos folículos pequeños e intermedios (123, 134), además de numerosos maduros.

Entre las estrategias alternativas a la administración de hCG que se han desarrollado para evitar la aparición de cuadros severos de hiperestimulación destaca, por su interés y relación con el presente trabajo, la sustitución de la hCG por una descarga endógena de LH mediante la administración de un análogo agonista de la GnRH (41, 77). Si bien algunos autores trataban de obtener una estimulación más fisiológica, Inmoedemhe (63) menciona su posible uso en pacientes con elevado riesgo de sufrir hiperestimulación severa. La corta vida media de la LH hipofisaria, de unos 60 minutos (86), sería uno de los fundamentos esenciales. Aunque los trabajos mencionados se referían a ciclos de superovulación para la aplicación de técnicas de reproducción asistida, Romeu y cols (126), en una publicación reciente, utiliza un análogo de la GnRH, como sustituto de la hCG, en 4 mujeres que presentaban un elevado riesgo de hiperestimulación y que fueron sometidas a tratamiento inductor de la ovulación con FSH pura. Ninguna de ellas presentó un cuadro de hiperestimulación, obteniéndose dos embarazos a término y otros dos evolutivos en el momento de la publicación. Ello apunta hacia la obtención de ciclos con ovulación de un número limitado de folículos, idealmente monoovulares, pero capaces de proveer ovocitos que den lugar a embriones de buena calidad (126, 150).

En el ciclo reproductivo de la coneja, la emigración de los embriones desde los oviductos hasta las cavidades uterinas se produce normalmente hacia las 72-78 después de la monta por el macho (102). Chang observó que la aceleración del tránsito de los preembriones conllevaba el que éstos alcanzaran los cuernos uterinos demasiado pronto y por lo tanto, no

podieran desarrollarse debido a la falta de adecuación del endometrio (17). Esta misma autora había observado que, además, los embriones de 1 día transferidos al útero no eran capaces de implantarse.

El papel que, sobre el transporte de los embriones en los oviductos y su posterior paso a los cuernos uterinos, juegan los esteroides ha sido objeto de numerosos estudios, atribuyéndose una función importante en este proceso al estradiol y a la progesterona (16, 52). Se ha atribuido una acción deletérea a la progesterona sobre el proceso de transporte del embrión en los oviductos (17). Por otra parte se ha sugerido que los cambios que experimentan los niveles de estradiol los primeros días después del coito poseen gran importancia en el control del transporte del embrión en los oviductos, requiriéndose la presencia de un estradiol elevado el tercer día postcoito con el fin de permitir su paso hacia el útero (27).

En los momentos en que tiene lugar el paso de los embriones desde los oviductos a los cuernos uterinos se produce un incremento de la fuerza y velocidad de las contracciones de los oviductos (58). Un mecanismo de acción atribuido al estradiol consistiría en el incremento de la sensibilidad del tejido oviductal, especialmente a nivel del istmo, a la estimulación nerviosa (65). Sin embargo también se ha sugerido que el pico preovulatorio del estradiol es responsable de la edematización de los oviductos y que puede bloquear temporalmente el transporte de los cigotos a nivel de la unión istmico-ampular, istmo y unión útero-ovárica (105).

En otro orden de cosas se ha podido documentar que la hCG incrementa la frecuencia y duración de la actividad espontánea del tejido muscular circular del oviducto 48 y 72 horas después de su administración (91). Este incremento de actividad coincide con observaciones

realizadas, después de inducir la ovulación a hembras con hCG, por otros autores que han comunicado la presencia de ovocitos y embriones en cavidades uterinas a las 60 horas de la administración de la hormona (57, 156), poniéndose de manifiesto de esta forma un tránsito oviductal acelerado causado presumiblemente por la hCG.

Desconocemos si la LH humana ejerce acciones similares a las descritas para la hCG por Meiri y cols (91) y en que períodos después de su administración. Resulta interesante el que se haya comunicado, tras la administración de FSH como tratamiento estimulador ovárico, la presencia de embriones en vagina 60 horas después del coito, en conjunción con un incremento de la secreción endometrial (34).

En nuestro estudio no recogimos ningún ovocito en oviductos en ninguno de los grupos. A las 72 horas todos los ovocitos habían alcanzado los cuernos uterinos, poniéndose de manifiesto una cierta aceleración de la emigración oviductal de los ovocitos respecto a los datos existentes en la bibliografía acerca del ciclo natural (57, 102, 156). La media de ovocitos recogidos en las cavidades uterinas fue significativamente mayor en el grupo de hembras que recibió hCG que en el que recibió LH. Sin embargo, este resultado por sí solo, no justifica la existencia de un tránsito más rápido en comparación con el de LH, sino que más probablemente es consecuencia del mayor número de ovocitos presentes en el grupo tratado con hCG.

En cuanto a los blastocistos, nuestros resultados ofrecen datos interesantes en relación a su localización a las 72 horas post-inducción de la ovulación e inseminación artificial. Así, en el grupo que recibió LHr, la mayoría de los blastocistos se encontraron en cuernos uterinos. Sin embargo el grupo tratado con hCG, presentaba la mayoría de los blastocistos en oviductos.

La diferencia entre ambos grupos fue significativa en relación a los embriones presentes en oviductos (media de 9 en el grupo hCG vs 2,4 en el grupo LHR) y por contra no lo fue en relación a los blastocistos presentes en cavidades uterinas (2,9 en el grupo hCG y 5,1 en el grupo LH). Estos resultados apuntan a que la LHR produce un tránsito oviductal de los blastocistos más rápido que la hCG.

Así, en el estudio de correlaciones, tanto en el grupo de hembras que recibió hCG como en el que recibió LHR, existió una relación directa y significativa entre el número de blastocistos en oviductos y los niveles de progesterona a las 48 y 72 horas, pero esta correlación, que fue más fuerte en el grupo hCG, apunta a una mayor permanencia de los blastocistos en los oviductos tras hCG (grupo LHR: con progesterona a las 48 horas  $r=0,7258$ , con progesterona a las 72 horas  $r=0,6601$ ; grupo hCG: con progesterona a las 48 horas  $r=0,8146$ , con progesterona a las 72 horas  $r=0,8153$ ). Estos datos parecen indicar a que, en efecto, la progesterona puede jugar un cierto papel de frenado del tránsito oviductal de los blastocistos, tal y como se ha descrito previamente (17), papel que se ha puesto de manifiesto especialmente en el grupo hCG, grupo en el que los niveles de progesterona fueron, globalmente, mayores que en el grupo LHR, sobre todo a las 24 horas de la administración de la hormona. En relación a los ovocitos presentes en cuernos (única localización en donde se presentaron), existió una relación inversa con los niveles de progesterona determinados a las 72 horas en el grupo LHR ( $r=-0,6428$ ). Esta relación fue directa, aunque a las 48 horas, en el grupo hCG ( $r=0,6780$ ). No se detectó la existencia de ninguna otra relación de interés entre los niveles hormonales y la localización de ovocitos o blastocistos.

En nuestro diseño experimental procedimos a estudiar la calidad embrionaria sacrificando un subgrupo compuesto por 10 hembras de cada grupo (LHR o hCG) a las 72 horas de la inducción



de la ovulación. La tasa de fecundación que encontramos fue similar en ambos grupos (91,1 % en el grupo LHR y 89,6 % en el grupo hCG). Dada esta similitud de las tasas de fecundación, y como consecuencia lógica del distinto número de folículos que ovuló con cada una de las hormonas, el número total de blastocistos fue significativamente mayor en el grupo de hembras que recibió hCG ( $11,5 \pm 0,97$ ) que en el que se administró LHR ( $7,6 \pm 0,97$ ).

Tanto las 8 hembras de este subgrupo que ovularon con hCG, como las 9 que lo hicieron tras recibir LHR presentaron embriones de buena calidad, correspondientes a los grados 1 y 2 de la clasificación de Veeck (151). Pero cuando se estudia la distribución de estos embriones en las tres categorías definidas para la realización de nuestro experimento, destaca el hecho de que, la tasa media de embriones de buena calidad (grados 1 y 2) respecto al total, resultó ser el doble en el grupo de hembras que recibió LHR respecto al que recibió hCG, concretamente fue  $67,8 \pm 5,26$  % en el grupo LHR frente a un  $33,5 \pm 3,01$  % en el grupo hCG. Esta diferencia alcanzó una elevada significación estadística ( $p = 0,00006692$ ); por su parte la tasa de embriones de calidad intermedia, grados 3 y 4, fue semejante en ambos grupos. En relación a los embriones degenerados, se invierte la relación existente para los embriones de buena calidad y surgen nuevas diferencias entre los grupos: mientras que en el grupo LHR la tasa media de embriones degenerados (grado 5) es del  $5,6 \pm 2,25$  %, en el grupo de hembras que recibió hCG la tasa es muy superior, alcanzando el  $27,3 \pm 4,7$  %, siendo esta diferencia altamente significativa ( $p = 0,0016498$ ). Existe, aparentemente, en ambos grupos una complementariedad en relación a la calidad embrionaria de forma que, en el grupo hCG, la mayor tasa de embriones degenerados se produce a expensas de los embriones de buena calidad, que ve así reducida su tasa, y viceversa en el grupo LHR, en el que se produce una tasa mucho más elevada de embriones de buena calidad.

Estos resultados coinciden parcialmente con los previamente publicados por González y Molina en relación al uso de LH humana urinaria (42, 96), en que se refiere que el porcentaje de embriones degenerados fue significativamente más alto para la hCG que para la LH. Sin embargo no se encontraron diferencias en el porcentaje de embriones de buena calidad, produciéndose la complementariedad en los embriones de calidad intermedia que supusieron un porcentaje significativamente más alto para la LH urinaria que para la hCG. Los autores destacan el hecho de que, en el estudio de los ovocitos, los obtenidos tras la inducción con hCG presentaban sistemáticamente una fragmentación del corpúsculo polar, fenómeno mucho más raro tras la inducción con LH urinaria. Esta alteración ovocitaria podría influir negativamente en su desarrollo posterior (153). En cualquier caso, los hallazgos en relación a la calidad ovocitaria mencionados son, también, parcialmente coincidentes con los publicados por Zelinski-Wooten y cols. (165). Estos autores compararon la calidad de los ovocitos obtenidos después de inducir la ovulación con FSH + hCG ó FSH + LH humana urinaria en monas (*macacus rhesus*), encontrando que el porcentaje de ovocitos atrésicos fue significativamente mayor entre los obtenidos de las hembras tratadas con hCG que entre los obtenidos de las hembras tratadas con LH humana urinaria (165).

La diferencia encontrada en nuestro estudio entre los grupos a favor de la LHR resulta sugestiva, por cuanto la capacidad de desarrollo posterior de los embriones varía de forma importante en función del grado de calidad morfológica al que pertenecen, al menos en el humano. Así los embriones de grado 1 y 2 presentan las mayores posibilidades de producir un embarazo evolutivo (46 y 28 % respectivamente), mientras que los embriones de los grados 3 y 4 presentan menos posibilidades (10 y 19 %) respectivamente. Los embriones degenerados apenas poseen capacidad para anidar y evolucionar posteriormente (5 %) (152). La mejora de la calidad ovocitaria y embrionaria constituye un objetivo principal en la investigación de

nuevos procedimientos para el tratamiento de la esterilidad (112). El ideal de un ciclo de inducción de la ovulación consiste en la obtención de un ciclo monoovular con el fin de evitar embarazos múltiples y cuadros de hiperestimulación. En un ciclo monoovular, la calidad embrionaria se transforma en el factor crítico por excelencia. Nuestro estudio ha ofrecido, en la coneja, una calidad embrionaria significativamente mejor para la LHr que para la hCG. En cualquier caso, hay que tener presentes las limitaciones que se derivan de las diferencias existentes entre especies, ya que los estudios de Veeck (152) están realizados sobre embriones humanos.

Uno de los objetivos establecidos para el presente estudio consistía en estudiar, más allá de los procesos ovulatorios y la fecundación y calidad embrionaria, la evolución del proceso implantatorio y las pérdidas parciales post-implantatorias hasta los 14 días después de la inducción de la ovulación. Para alcanzar este objetivo se estudió el número de embriones totales, el de embriones en regresión y embriones en desarrollo, así como las tasas de implantación y de pérdidas parciales hasta el día 14.

Aunque en relación al número de embriones totales, observados a los 14 días, la tendencia fue hacia un mayor número en el grupo hCG, consecuencia lógica del mayor número de cuerpos lúteos presentes y ovocitos ovulados, no se alcanzó significación estadística (hCG:  $12 \pm 1,2$ ; LH:  $9,3 \pm 1$ ;  $p=0,10724$ ). Tampoco se evidenció ninguna diferencia significativa ni en el número de embriones en desarrollo, ni en el de embriones en regresión, que fueron semejantes para ambos grupos. Por lo tanto las diferencias existentes hacia un mayor número de blastocistos que encontramos a las 72 horas para la hCG disminuyen sustancialmente, y en la práctica desaparecen a los 14 días.

Adams (1) realizó un estudio sobre las pérdidas pre y post-implantatorias que se producen en la coneja. En relación a las pérdidas post-implantatorias encontró que, a los 8 días postcoito, estaba en regresión el 20,2 % de los embriones implantados. En nuestro estudio las pérdidas parciales hasta el día 14 de gestación alcanzaron el  $10,2\pm 3,3$  % en el grupo LHR, y el  $8,6\pm 2,5$  % en el grupo hCG, no siendo significativa la diferencia entre ambos. Estas tasas son considerablemente más bajas que las publicadas por Adams (1). Cuando procedimos a calcular la tasa de implantación pudimos constatar una tasa significativamente superior en el grupo LHR que en el grupo hCG, (LHR:  $96,9\pm 1,6$  %; hCG:  $89,4\pm 2,5$  %;  $p=0,024053$ ).

Cuando se realizó el cálculo de correlaciones entre el número de embriones en desarrollo y el de cuerpos lúteos, aunque en ambos grupos encontramos una correlación directa con un coeficiente muy elevado, como lógicamente cabía esperar, ésta relación fue mejor en el grupo LH que en el hCG (LH: 0,96704; hCG: 0,92001). Un fenómeno semejante sucedió en relación al número de embriones totales y el de cuerpos lúteos. Esto viene a reforzar, de forma indirecta, la mejor viabilidad, no sólo de los ovocitos, sino de los embriones obtenidos, aunque fueran menos numerosos, tras la administración de LHR que tras la administración de hCG.

En el estudio de correlaciones entre los distintos grados de calidad embrionaria obtenidos a las 72 horas y las tasas de implantación posteriores (a los 14 días), únicamente en el grupo hCG existió una relación inversa significativa entre el porcentaje de embriones de calidad buena e intermedia y la tasa de implantación ( $r=-0,71755$  y  $r=-0,6966$  respectivamente). O sea que, en el grupo hCG, resulta aparente que el menor porcentaje de implantación, en relación al grupo LHR, se produce no sólo como consecuencia de una menor calidad embrionaria, que se ponía de manifiesto en el estudio a las 72 horas, sino también porque los embriones de calidad buena e intermedia anidan en menor medida que en el grupo LHR. En este mismo

grupo hCG, la presencia de embriones de calidad intermedia (Grados 3-4) presentó una correlación significativa con la tasa de pérdidas parciales post-implantatorias ( $r= 0,72557$ ) lo que, probablemente, indica que las pérdidas parciales se producen, en buena medida, a expensas de los embriones de calidad intermedia en este grupo. Estas relaciones sólo se pusieron de manifiesto en el grupo hCG. Dado que la clasificación de la calidad embrionaria se hizo siguiendo criterios estrictamente morfológicos (151), la lectura de estos datos apunta a que existen otros factores no meramente morfológicos y no elucidados, que pueden condicionar la correcta implantación y la ocurrencia de pérdidas post-implantatorias embrionarias en este grupo que recibió hCG, no produciéndose implantaciones de embriones de buena o intermedia calidad morfológica y produciéndose pérdidas post-implantatorias esencialmente a cuenta de los embriones de calidad intermedia.

De los datos anteriores se desprende que, a pesar del mayor número de folículos con ovulación (cuerpos lúteos) y ovocitos obtenidos en el grupo hCG, los ovocitos obtenidos tras la administración de LHr dieron lugar, en términos relativos, a más embriones de buena calidad que, a su vez, permitieron obtener una mejor tasa de implantación determinada a los 14 días de la inducción de la ovulación y de la práctica de la inseminación artificial. Estos resultados vienen a reforzar los hallazgos realizados previamente por Molina y cols. (42, 96) quienes, a las 48 horas después de la administración de LH urinaria o hCG (+ monta), observaron la presencia de una mejor calidad morfológica embrionaria entre las hembras que recibieron LH urinaria.

El posible papel deletéreo jugado por las alteraciones en el equilibrio esteroideo ha sido objeto de atención, atribuyéndose a los desequilibrios existentes entre el estradiol y la progesterona un papel negativo sobre las tasas de fertilización y la calidad embrionaria en

gatos (45). Además, en ratones, la elevación del cociente estradiol/progesterona durante la fase lútea temprana se ha asociado a una disminución de la capacidad de implantación por parte de los embriones y a alteraciones metabólicas en los mismos, debido a la producción de alteraciones endometriales (129). Molina y cols (97), en su estudio hormonal tras LH urinaria y hCG consideran que resulta posible que los niveles de estradiol, relativamente elevados, hallados tras la hCG, sean consecuencia de un cierto grado de hiperestimulación, producida por el propio tratamiento, y que se produzca la ovulación de folículos no viables, atrésicos o inmaduros. En tal sentido los efectos de la hCG serían menos selectivos que los de la LH, aunque en este último caso, como ya se ha discutido anteriormente, debido al abordaje experimental utilizado (con monta de la hembra por el macho), se suman los efectos de la hCG con los de la LH endógena liberada de forma refleja (145), lo que no permite abordar, probablemente, de forma adecuada este problema.

En relación a este fenómeno, en nuestro estudio, tanto en el grupo que recibió LHR como en el que recibió HCG existió una correlación inversa y significativa entre la tasa de implantación y los niveles de estradiol alcanzados hacia las 48 o 72 horas. Esta correlación fue mucho más importante en el grupo LHR que en el grupo hCG ( $r=-0,92738$  para LHR a las 72 horas;  $r=-0,75376$  para la hCG a las 48 horas). Estos resultados señalan, en efecto, un posible papel deletéreo del estradiol, cuando alcanza determinados niveles, sobre el desarrollo embrionario, referido anteriormente por otros autores (45, 129).

La capacidad de implantación del embrión depende, como uno de los factores esenciales, de la calidad embrionaria y su capacidad para anidar en el endometrio (152). El otro factor esencial viene constituido por el ambiente hormonal y la receptividad endometrial (112). En relación al primero de los factores, calidad embrionaria, los datos expuestos confirman los

previamente obtenidos, a las 72 horas, en el sentido de que la mayor calidad embrionaria obtenida con la LHr trasciende hacia las etapas siguientes, traduciéndose en un incremento de la tasa de implantación. Nuevamente podemos ver como la administración de la LHr parece condicionar más positivamente que la hCG la calidad y evolución embrionarias.

El estradiol juega, en la coneja, un importante papel luteotrópico (21, 50, 68, 93) constituyendo el principal responsable del mantenimiento de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (89) y siendo los folículos grandes que están presentes en los ovarios de la coneja preñada la principal fuente de estrógenos luteotrópicos (93). El estradiol produce un cambio en la estructura celular, incrementando la biogénesis del sistema endoplásmico rugoso y del sistema mitocondrial en las células lúteas para incrementar los mecanismos esteroidogénicos (12).

La progesterona, por su parte, resulta imprescindible para la implantación de los embriones (5), mientras que el estradiol en la coneja no parece esencial en este proceso (47), aunque ejerce un efecto potenciador sobre la progesterona, pudiendo disminuir los requerimientos de la misma (140).

En relación a los niveles de estradiol en plasma encontrados en nuestro estudio, no se puso de manifiesto la existencia de ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos LHr y hCG en ninguno de los momentos en que se determinó este esteroide. En ambos grupos de tratamiento se produjo un descenso de los valores del estradiol a las 24 y 48 horas de la administración de la LHr o de la hCG respecto de sus valores preovulatorios. Este descenso alcanzó una elevada significación estadística en el grupo hCG, pero no en el grupo LH; a las 72 horas los valores de estradiol se recuperaron en ambos grupos por encima de

los valores preovulatorios. Cuando analizamos este comportamiento bifásico mediante el análisis de la varianza, encontramos que, en ambos grupos de tratamiento, las variaciones fueron significativas, aunque las modificaciones en el grupo hCG fueron más acusadas, alcanzando una mayor significación estadística.

Las cifras así como el perfil de estradiol que ofrecen nuestros resultados es coincidente con el detectado por otros autores (24, 104). Osteen y cols (104) observaron una caída del 27 y 50 % en la cantidad de estradiol presente en sangre periférica y sangre procedente de la vena ovárica respectivamente, a las 24 horas de la administración de una dosis de hCG a conejas y una recuperación posterior que se iniciaba a las 24 horas post-hCG. En nuestro estudio, en términos generales, el estradiol se comportó de forma semejante en ambos grupos, LHR y hCG, con algunas salvedades derivadas del grado de significación de las variaciones observadas, que serán tratadas más adelante.

La hCG posee, en la coneja, un efecto luteolítico que ha sido objeto de algunos estudios (21, 69, 163). Este efecto puede ser revertido por la acción del estradiol (164). Un mecanismo primario por el que la hCG parece producir este efecto luteolítico consiste en el propio fenómeno ovulatorio, por el que se detiene la síntesis de estradiol, la hormona luteotrófica por excelencia en la coneja (69). Otro mecanismo propuesto ha sido la disminución de respuesta del cuerpo lúteo al estradiol ejercida por la hCG (21, 163). Keyes y cols. (69) postulan que la puesta en marcha de uno o ambos mecanismos luteolíticos está en función de la dosis; así dosis reducidas de hCG actuarían reduciendo los niveles de estradiol mediante la puesta en marcha del proceso ovulatorio, mientras que dosis elevadas reducirían, además, la presencia de receptores a estradiol en las células lúteas.



En nuestro estudio la hCG redujo más drásticamente los niveles de estradiol que la LHr, según ha puesto de manifiesto el análisis de la varianza realizado y el análisis de la t de Student para muestras apareadas, que mostró una disminución significativa a las 24 horas y en tal sentido su efecto luteolítico debería haber sido, aparentemente, más intenso que el de la LHr. Sin embargo, en ningún momento se puso de manifiesto un mayor efecto luteolítico de la hCG respecto de la LHr, en base a los niveles de progesterona observados. Por el momento no se dispone de publicaciones que refieran la existencia o no de un papel luteolítico para la LHr.

Ya hemos mencionado que, en la coneja, la implantación se relaciona de forma crítica con la progesterona (5, 47) que se constituye en el esteroide esencial del proceso implantatorio. Resulta cuanto menos interesante que, cuando estudiamos las tasas de implantación en nuestro experimento, éstas fueron significativamente menores en el grupo de hembras que recibió hCG que en el que recibió LHr. Además, cuando se estudiaron los cocientes existentes entre el estradiol y las estructuras ováricas con las que posee algún tipo de relación funcional, encontramos que el estradiol por cuerpo lúteo fue más bajo en el grupo hCG que en el grupo LHr ( $p=0,096753$ , casi significativo). No estamos en condiciones de poder responder a la cuestión de si esta reducción en el cociente estradiol/cuerpo lúteo constituye el reflejo de una mayor actividad luteolítica de la hCG respecto a la LHr, quizá mediada por la reducción de los niveles de estradiol, que se pueda traducir en una disminución de las tasas de implantación, sobre todo si se tiene presente el trabajo de Mills (93) quien publicó que, hasta el día 3 post-coito, el cuerpo lúteo está dotado para crecer sin necesidad de la presencia de estradiol, mientras que, a nivel endometrial, a la 24 horas se produce un incremento del contenido de receptores para el estradiol, tanto nucleares como citosólicos (73).

A las 72 horas observamos un incremento en los niveles de estradiol, que se situaron por

encima de los valores preovulatorios, coincidente con el observado en otros estudios (73, 104). Este incremento puede ser atribuido a la producción de una nueva oleada de folículos en desarrollo y es de interés por cuanto estos folículos proveerán el estradiol esencial para el mantenimiento del cuerpo lúteo (104). Los niveles de estradiol alcanzados en este momento fueron semejantes en ambos grupos de tratamiento.

En el grupo LHr el número de folículos preovulatorios se correlacionó mejor (significativamente) con los niveles de estradiol a las 24 horas ( $r=0,64797$ ); esta relación fue no solo más débil, sino que se invirtió en el grupo hCG ( $r=-0,42739$ ); en el mismo grupo existió, a las 48 horas de la administración de la hormona, una buena correlación, directa, entre los niveles de estradiol y los de progesterona. Sin embargo en el grupo hCG en ningún momento se puso de manifiesto la existencia de correlaciones de interés entre estos dos esteroides. Todo ello constituye, presumiblemente, la expresión de una más armónica producción esteroidea en el grupo LHr que en el grupo hCG.

Además, en el grupo de hembras que recibió hCG detectamos la existencia de una correlación directa y significativa entre los embriones de calidad intermedia y los niveles de estradiol medidos a las 48 horas ( $r=0,69576$ ), que no existió en el grupo que recibió LHr. Por otra parte ya hemos hecho mención al hallazgo de la relación inversa entre los niveles de estradiol a las 48/72 horas y la tasa de implantación.

Los valores de progesterona se incrementaron desde sus valores preovulatorios y alcanzaron niveles semejantes en ambos grupos a las 72 horas de la administración de la hormona correspondiente,  $1265\pm 234$  pg/ml y  $1381\pm 230$  pg/ml para el grupo LH y hCG respectivamente. Estos valores son similares a los comunicados en la literatura para este mismo momento post-

coito o post-hCG (13). El análisis de la varianza también mostró que las variaciones observadas a lo largo de las 72 horas de estudio fueron significativas en ambos grupos. No obstante las modificaciones fueron mucho más notorias en el grupo hCG (valor de  $p < 0,001$  para hCG vs  $p < 0,01$  para LH; ANOVA). Además, en el grupo hCG, a las 24 horas post-inducción de la ovulación, los niveles de progesterona se habían elevado significativamente sobre sus valores preovulatorios y eran significativamente más altos que en el grupo LHR. Así, en el grupo LHR a las 24 horas no se produjo ningún incremento sobre los valores preovulatorios, no siendo hasta las 48 horas que los valores de progesterona mostraron una elevación. En general los valores de progesterona fueron más altos en el grupo hCG. Estos datos coinciden con los obtenidos en estudios previos (42, 97) realizados con un extracto de LH pura urinaria, en que también a las 24 horas postinducción de la ovulación los niveles de progesterona fueron significativamente más elevados en las hembras que recibieron hCG que en las que recibieron LH.

La diferencia significativa observada en el valor del cociente progesterona/cuerpo lúteo en el momento preovulatorio se debe muy probablemente a una distorsión provocada por la PMSG, por cuanto esta hormona incrementa el contenido de progesterona en los ovarios de la coneja prácticamente a cualquier dosis (162), aunque no es capaz de inducir ovulaciones ni siquiera tras administraciones repetidas de 50 UI (162). A las 24 y 48 horas postinducción de la ovulación, el cociente progesterona/CL era muy similar en ambos grupos, momentos en que el efecto distorsionador descrito bien pudo haber desaparecido. Sin embargo, este cociente fue superior a las 72 horas en el grupo LHR que en el grupo hCG ( $160 \pm 24,5$  pg vs  $129 \pm 8,6$ ), aunque con nuestra casuística esta diferencia no alcanzó significación estadística. Se ha sugerido que este mayor cociente, teniendo en cuenta la presencia de niveles de progesterona mayores en el grupo hCG, puede ser indicativo de un mejor funcionalismo de los cuerpos lúteos obtenidos

tras la administración de LH que tras la administración de hCG (97). Cabe la posibilidad de que ésto pueda ser debido al distinto efecto luteinizante que pueda jugar la LH en relación a la hCG.

Cuando calculamos el valor del cociente progesterona/potencial ovulatorio el fenómeno se invirtió respecto al cociente anteriormente discutido (progesterona/cuerpos lúteos), siendo significativamente mayor a las 24 horas, y casi significativamente mayor a las 48 horas, en el grupo hCG y también a las 72 horas, aunque perdiendo la significación.

De nuevo tenemos que hacer mención a las posibles diferencias interespecie. En el estudio publicado por Zelinski-Wooten (165), utilizando LH humana urinaria y hCG para inducir la ovulación en monas, se puso de manifiesto una pobre secreción de progesterona cuando únicamente se administró la dosis ovulatoria de LH urinaria, a pesar de que los mecanismos de transformación ovocitaria se produjeron de forma adecuada. Por contra, con la administración de pequeñas dosis de LH urinaria durante la fase lútea, la secreción de progesterona alcanzó niveles semejantes a cuando se administró hCG. En este trabajo el porcentaje de ovocitos atrésicos fue menor cuando se utilizó LH urinaria que cuando se administró hCG (165). Por otra parte Simon y cols. (139), en su trabajo pionero utilizando LHR en monas, también realizaron un aporte suplementario de LHR durante la fase lútea tras la administración de la dosis ovulatoria, obteniendo una fase lútea normal.

En nuestro estudio, realizado en conejas, a pesar de la corta vida media de la LHR, la secreción de progesterona a las 72 horas fue semejante entre los grupos que recibieron LHR y hCG y los resultados a los 14 días, en cuanto a porcentaje de implantación, fueron más favorables para la LHR.

En cuanto al estudio de correlaciones detectamos algunas diferencias entre uno y otro grupo. En ambos casos existió la relación directa, que cabía esperar, entre los niveles de progesterona a las 48/72 horas y el número de cuerpos lúteos, más importante para la hCG. Lo mismo sucedió entre los valores de este esteroide en los momentos referidos y el número total de blastocistos. En el grupo hCG existieron relaciones directas entre la progesterona a las 48 y 72 horas y los embriones de calidades buena e intermedia, mientras que en el grupo LH únicamente existió con los embriones de calidad intermedia

Por su parte, en el grupo LHR la progesterona a las 72 horas se relacionó de forma directa y significativa con la tasa de fecundación. En el grupo hCG esta correlación no alcanzó ninguna significación.

Los cocientes estradiol/progesterona, calculados en los momentos en que se determinaron estos esteroides, no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo llama la atención la existencia de una correlación significativa inversa entre el número de embriones de buena calidad y el cociente estradiol/progesterona existente a las 72 horas de la inducción de la ovulación en el grupo hCG ( $r=-0,7283$ ) y que no existió en el grupo LHR. Safro y cols (129) habían puesto de manifiesto que la existencia de cocientes estradiol/progesterona elevados influían negativamente en el proceso implantatorio y en el metabolismo embrionario. La relación encontrada por nosotros y anteriormente por otros autores (45), apoya la idea de que los desequilibrios hormonales, afectan negativamente, no sólo el proceso implantatorio, sino los eventos embrionarios inmediatamente anteriores.

## **8. CONCLUSIONES**

1. La LH humana de origen recombinante es capaz de desencadenar eficazmente la ovulación en conejas previamente sometidas a estimulación ovárica mediante la administración de PMSG.
2. La administración de 50 UI de LH humana recombinante produce una menor tasa de ovulación, un menor número de cuerpos lúteos y un menor número de embriones, que la administración de una dosis semejante de hCG.
3. La LH humana recombinante produce una mejor calidad embrionaria, determinada a las 72 horas de la inseminación artificial, que la hCG; esta mejor calidad se traduce por la presencia de una mayor proporción de embriones de buena calidad y una menor proporción de embriones degenerados.
4. La LH humana recombinante produce un mayor porcentaje de implantación a los 14 días postinseminación que la hCG.
5. La LH humana recombinante produce un tránsito más rápido de los blastocistos por los oviductos que la hCG.
6. La LH recombinante tiende a producir un mejor equilibrio esteroideo durante las 72 horas posteriores a su administración que la hCG.

VERIFICADA EN EL DIA DE HOY LA LECTURA DE LA TESIS

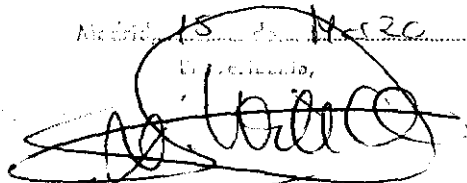
TITULO DE INVESTIGACION DE LAS ANOVIGAS Y  
DIFERENCIAS ENTRE LA LA RECOMBINANTE Y LA  
VCC EN EL PROCESO REPRODUCTIVO FARMACOLOGICAMENTE  
INDUCIDO EN LA CONEJA  
DE LA CITE EL AUTOR CON JURE ANTONIO

PEINADO PEINADO

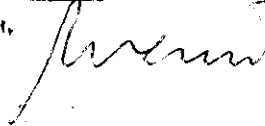
CURSO POR ~~EL~~ LA COMISION DEPARTO. DE SAUDE

Medio 18 de Marzo de 1994

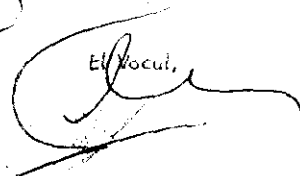
El presidente,



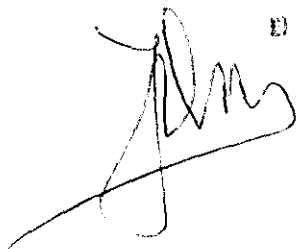
El Vocal,



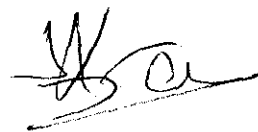
El Vocal,



El Vocal,



El Vocal Secretario,





## **9. BIBLIOGRAFIA**

- 1.- **ADAMS, C.E. (1960)**  
**Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*: the amount and distribution of loss before and after implantation.**  
**J Endocrin 19:325-344**
- 2.- **ADAMS, C.E. (1968)**  
**Ovarian response to human chorionic gonadotropin and egg transport in the pregnant and postparturient rabbit.**  
**J. Endocrinology 40:101-105**
- 3.- **BAIRD, D.T. (1988)**  
**Factors regulating the growth of the preovulatory follicles in the sheep and the human**  
**J. Reprod Fertil 69:343-652**
- 4.- **BEIER, H.M. (1976)**  
**Uteroglobin and related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit.**  
**J Reprod Fertil 25:53-69**
- 5.- **BEIER, H.M., BEIER-HELLWIG, K., DELBOS, R. (1983)**  
**Hormones and proteins involved in uterine preparation for implantation.**  
**En: Beier and Lindner eds Fertilization of the human Egg in vitro.**  
**Springer-Verlag. Berlin Heidelberg pp 307-327**
- 6.- **BEYER, R. and RIVAUD, N. (1969)**  
**Sexual behaviour in pregnant and lactating domestic rabbits.**  
**Physiology and Behaviour 4: 753-757**
- 7.- **BEYER R., McDONALD, P. (1973)**  
**Hormonal control of sexual behaviour in the female rabbits**  
**Av Rep Physiol 6:185-219**
- 8.- **BIDART, J.M., TROALEN, F., BELLET, D. (1993)**  
**Structure-activity relationship of human chorionic gonadotropin.**  
**En: The New Frontier in Ovulation Induction, Jacobs, H.S. ed. The Partenon Publishing Group, Casterton Hall, Carnforth. 1993 pp 49-67.**
- 9.- **BOMSELL-HELMREICH, O., HUYEN, N., VU, L., DURAND-GASSELIN, J. (1989)**  
**Effects of varying doses of hCG on the evolution of preovulatory rabbit follicles and oocytes.**  
**Hum Reprod 4:636-642**
- 10.- **BOURDAGE, R.J., HALBEERT, S.A. (1988)**  
**Distribution of embryos and 500uM microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport.**  
**Biol Reprod 38:282-291.**

- 11.- **BOUSSIT, D. (1989)**  
Reproduction et insemination Artificielle en Cuniculture. Le materiel de collecte. Ed. Association Française de Cuniculture. Lempdes. pp 104-115
- 12.- **BRONSTEIN, R.D., HOLT, J.A., ZIRKIINN, B.R. (1984)**  
Estradiol-induced changes in progesterone secretion by rabbit corpora lutea are associated with quantitative ultrastructural changes in luteal cells.  
Endocrinology 115:342-349.
- 13.- **BROWNING, J.Y., KEYES, P.L., WOLF, R.C. (1980)**  
Comparison of serum progesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, and estradiol-17 $\beta$  in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy.  
Biol Reprod 23:1014-1019
- 14.- **BUVAT, J., BUVAT-HERBAUT, M., MARCOLIN, G., DEHAENE, J.L., VERBECQ, P., RENOARD, O. (1989)**  
Purified follicle-stimulating hormone in polycystic ovary syndrome: slow administration is safer and more effective.  
Fertil Steril 52:553-559
- 15.- **CATT, J.K., DUFAU, M.L. (1991)**  
Gonadotropic hormones: biosynthesis, secretion, receptors and actions.  
En: Reproductive Endocrinology. Yen y Jaffre eds. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. USA. pp 105-155.
- 16.- **CHANG, M.C., HARPER, M.J.K (1966)**  
Effects of ethinyl estradiol on egg transport and development in the rabbit.  
Endocrinology 78:860-872
- 17.- **CHANG, M.C. (1967)**  
Effects of progesterone and related compounds on fertilitation, transportation and development of rabbit eggs.  
Endocrinology, 81:1251-1260
- 18.- **CHEN, H.C., SHIMOHIGASHI, Y., DUFAU, M.L., CATT, K.J. (1982)**  
Characterization and biological proprieties of chemically deglycosilated human chorionic gonadotropin: role of carbohydrate moieties in adenylate cyclase activation.  
J Biol Chem 257:14446-14452
- 19.- **CONBARNOUS, Y. (1989)**  
Comparative approach of structure function relationships of gonadotropins.  
Serono Symposia. Raven Press 65:82-93

- 20.- DAMEWOOD, M.D., SHEN, W., ZACUR, H.A., SCHLAFF, W.D., ROCK, J.A., WALLACH, E.E. (1989)  
Disappearance of exogenously administered human chorionic gonadotropin.  
Fertil Steril 52:398-400
- 21.- DAY, S.L., BIRNBAUMER, L. (1980)  
The effect of estradiol and hormonally stimuable adenylyclase activity and on progesterone production in normal and regressing corpora lutea from control and human chorionic gonadotropin-treated pseudopregnant rabbits.  
Endocrinology 106:375-381
- 22.- DONINI, P., PUZZUOLI, D., MONTEZENIOLA, R. (1964)  
Purification of gonadotropins from human menopause urine.  
Acta Endocrinologica (Kbh) 45:321-328
- 23.- DORRINGTON, J.H., ARMSTRONG, D.T. (1979)  
Effects of FSH on gonadal functions  
Recent Prog Horm Res 35:301-303
- 24.- DUGRE, F.J., LAMBERT, R.D., BELANGER, A., FORTIER, M.A., CARON, S. (1989)  
Local effect of the rabbit embryo-foetus on uterine progesterone and pregnenolone levels.  
Molecular and Cellular Endocrinology 64:252-255
- 25.- DUNKEL, L., JIA, X.C., NISHIMORI, K., BOIMEE, I., HSUEH, A.J.W. (1993)  
Deglycosilated Human chorionic gonadotropin (hCG) antagonizes hCG stimulation of 3',5'-cyclic adenosinee monophosphate accumulation through a noncompetitive interaction with recombinant human luteinizing hormone receptors.  
Endocrinology 132:763-769.
- 26.- EGEA, D., RODRIGUEZ, J.M., VAZQUEZ, C. (1983).  
Técnica de inseminación artificial utilizada en eel CRIDA 06-ETSIA (Madrid)  
Actas del VIII Congreso Nacional de Cunicultura. Toledo. pp 143-149.
- 27.- EL-BANNA, A.A., SACHER, B. (1977)  
A study on steroid hormone receptors in the rabbit oviduct and uterus during the first few days after coitus and during egg transport.  
Biol Reprod 17:1-8
- 28.- EMPERAIRE, J.C., RUFFIE, A. (1991)  
Trigering ovulation with endogenous luteinizing hormone may prevent the ovarian hyperstimulation syndrome  
Human Reprod 6:506-510

- 29.- FIDDES, J.C., TALMADGE, K. (1984)  
Structure, expression and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones.  
Reecen Prog Horm Res 40:43-56
- 30.- FISHER, B., MEUSR, G. (1988)  
A two year follow-up of effects of biotechniques on reproduction in the domestic rabbit.  
Lab Animal 22:5-15
- 31.- FISHER, R.A., NAKAJIMA, S.T., GIBSON, M., BRUMSTED, J.R. (1993)  
Ovulation after intravenous and intramuscular human chorionic gonadotropin.  
Fertil Steril 60:418-422.
- 32.- FORMAN, R.G., FRYDMAN, R., EGAN, D., ROSS, C., BARLOW, D.H. (1990)  
Severe hyperstimulation syndrome using agonists of gonadotropin-releasing hormone  
for in vitro fertilization: a European series and proposal for prevention.  
Fertil Steril 53:502-509
- 33.- FRITZ, M.A., SPEROFF, L. (1982)  
The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and  
neuroendocrine mechanisms.  
Fertil Steril 38:509-529
- 34.- FUJIMOTO, S., RAWSON, J.M., DUKELOW, W.R. (1974)  
Hormonal influences on the time of ovulation in the rabbits as determined by  
laparoscopy.  
J Repro Fertil 38:97-103
- 35.- GARCEA, N., CAMPO, S., PANETTA, V., VENERI, M., SICCARDI, P., DARGENIO, R., DE  
TORNASI, F. (1985)  
Induction of ovulation with purified urinary follicle-stimulating hormone in patients  
with polycystic ovarian syndrome.  
Am J Obstet Gynecol 151:635-640
- 36.- GARCIA XIMENEZ, F. (1982)  
Genética y selección de caracteres reproductivos en el conejo de carne.  
En: Tesis Doctoral: Universidad Politécnica de Valencia.
- 37.- GHARIB, S.B., WIERMAN, M.E., SHUPNIK, M.A., CHIN, V.W. (1990)  
Molecular biology of the pituitary gonadotropins.  
Endocr Rev 11:177-189.
- 38.- GEMZELL, C.A., DICZFALUSY, E., TILLINGER, K.G. (1958)  
Clinical effect of human pituitary follicle stimulating hormone.  
J Clin Endocrinol Metab 18:1333

- 39.- GOLAN, A. RON-EL, R., HERMAN, A., WEINRAUB, Z., SOFFER, Y., CASPI, E. (1988)  
Ovarian hyperstimulation syndrome following D-Trp-6 luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules and menotropin for in vitro fertilization.  
Fertil Steril 50:912-916
- 40.- GOLDENBERG, R.L., VAITUKAITIS, J.L., ROSS, G.T. (1972)  
Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth.  
Endocrinology 90:1492-1498
- 41.- GONEN, Y., BALAKIER, H., POWELL, W., CASPER, F. (1990)  
Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization.  
J Clin Endocrinol Metab 71:918-922
- 42.- GONZALEZ SANTANA, A. (1992)  
Efectos de la administración de LH pura urinaria versus hCG, sobre la inducción de la ovulación, calidad ovocitaria y embrionaria, y ambiente hormonal periférico en conejas.  
En: Tesis Doctoral. Universidad de Valencia Estudi General
- 43.- GOODMAN, A.L., NIXON, W.E., JOHNSON, D.E. AND HODGEN, G.D. (1977)  
Regulation of folliculogenesis in the cycling rhesus monkey: selection of the dominant follicle.  
Endocrinology 100:155-161
- 44.- GOODMAN, A.L., HODGEN, G.D. (1993)  
The ovarian triad of the primate menstrual cycle.  
Recent Prog Horm Res 39:1-73
- 45.- GOODROWE, K.L., HOWARD, J.G., WILDT, D.E. (1988)  
Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol 17- $\beta$  and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus.  
Journal of Reproduction and Fertility 82:553-561
- 46.- GOUGEON, A. (1990)  
Follicular Growth to Ovulation  
En: Edwards R.G. ed. Establishing a successful human pregnancy.  
Serono Symposia Publications From Raven Press. New York. Vol 66 pp 49-62
- 47.- HAFEZ, E.S.E., PINCUS, G. (1956)  
Hormonal requirements for implantation in the rabbit.  
Proc Soc Exp Biol Med 91:531-534
- 48.- HAMBLEN, E.C., DAVIS, C.D. (1945)  
Treatment of hypoovarium by the sequential and cyclic administration of equine and chorionic gonadotropins.  
Am J Obstet Gynecol 50:137

- 49.- HAMILTON-FAIRLEY, D., KIDDY, D., WATSON, H., SAGLE, M., FRANKS, S. (1991)  
Low-dose gonadotropin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome.  
*Human Reprod* 6:1095-1099
- 50.- HAMMOND, J., ROBSON, J. (1951)  
Local maintenance of the rabbit corpus luteum with oestrogen.  
*Endocrinology* 49:384-389
- 51.- HANING, R.V., STRAWN, E.Y., NOLTEN, W.E. (1985)  
Pathophysiology of the ovarian hyperstimulation Syndrome  
*Obstet Gynecol* 66:220-224
- 52.- HARPER, M.J.K. (1966)  
Hormonal control of transport of egg in cumulus through the ampulla of the rabbit oviduct.  
*Endocrinology* 78:568-574
- 53.- HATTON, J.B., KELUS, A.S., LEIBO, S.P. (1985)  
Transfer of fresh and frozen-thawed rabbit embryos to produce live young.  
*Experientia* 41:755-756
- 54.- HILLIARD, J., HAYWARD, J., SAWYER, C.H. (1964)  
Postcoital patterns of secretion of pituitary gonadotropins and ovarian progesterin in the rabbit.  
*Endocrinology* 75:957-963
- 55.- HODGEN, G.D. (1982)  
The dominant ovarian follicle.  
*Fertil Steril* 38:281-290
- 56.- HODGEN, G.D. (1990)  
Follicle selection  
En: *Gamete Physiology*. Asch, R., Balmaceda, J.P., Johnston, I. eds. Serono Symposia USA. Norwell, Mass. pp 153-161
- 57.- HODGSON, B.J. PAUERSTEIN, C.J. (1976)  
Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after hCG or coitus induced ovulation.  
*Biol Reprod* 14:377-381
- 58.- HODGSON, B.J., NORK, T.M., HEESCH, C.M., JOHNS, A. (1980)  
Effect of ovulation and estrogen and progesterone on mechanical properties of smooth muscle of rabbit oviducts.  
*Biol Reprod* 22:1160-1167.

- 59.- HOFF, J.D., QUIGLEY, M.E., YEN, S.S.C. (1983)  
Hormonal dynamics at mycycle: a reevaluation.  
J. Clin Endocrinol Metab 57:792-796
- 60.- HOFFMAN, D.I., LOBO, R.A., CAMPEAU, J.D., TSAS, H.M., HOLMBERG, E.A., ONO, T.,  
FREDERICK, J.J., PLATT, L.D., DIZEREGA, D.S. (1985)  
Ovulation induction in clomifene-resistant anovulatory women. Differential follicular  
response to purified urinary follicle-stimulating hormone (FSH) versus purified urinary  
FSH and luteinizing hormone.  
J Clin Endocrinol Metab 60:922-927
- 61.- HSUEH, A.J.W., DUNKEL, L.,BOIME, I. (1993)  
Recombinant human gonadotropin receptors.  
En: Shlomo Melmed ed. Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders-1993.  
Proceedings of the 3rd International Pituitary Congress. Endocrine Research and  
Education, Inc. Los Angeles, CA. pp 81-85
- 62.- HULOT, F., MARIANA, J.C. (1982)  
Comparison de la population des follicules preovulatoires entre deux suoches de lapins,  
effect de laa parite et de la saison.  
En: Libro de actas de 3eme Journees de la recherche cunicule. Paris. Comunicación no.  
13.
- 63.- IMOEDEMHE, D.A.G., SIGUE, A.B., PACPACO, E.L.A., OLAZO, A.B. (1991).  
Stimulation of endogenous surge of luteinizing hormone with gonadotropin releasing  
hormone analog after ovarian stimulation for in vitro fertilization.  
Fertil Steril 55:328-332
- 64.- ITSKOVITZ, J., BOLDES, R., LEVRON, J., ERLIK, Y., KAHANA, L., BRANDES, J.M. (1991)  
Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian  
hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist.  
Fertil Steril 56:213-220
- 65.- JOHNS, A., RADICKE, D.A., PAUERSTEIN, C.J. (1980)  
Effect of ovulation and progesterone or estrogen on the responses of the rabbit oviduct  
to nerve stimulation.  
Biol Reprod 22:772-776
- 66.- KALYAN, N.K., BALH, O.P. (1983)  
Role of carbohydrate in human chorionic gonadotropin: effect od deglycosilation on the  
subunit interaction and on its in vitro and in vivo biological proprieties.  
J Biol Chem 258:67-74
- 67.- KATZ, M., LUNENFELD, B., INSLER, V. (1973)  
Induction of ovulation with gonadotropins.  
S Afr Med J 47:1272-1280



- 68.- KEEYES, P.L., YUH, K.M. (1979)  
Estrogen action in the corpus luteum  
Advances in experimental Medicine and Biology 112:447-463
- 69.- KEEYES, P.L., POSSLEY, R.M., YUH, K-C.M. (1983)  
Contrasting effects of estradiol-17 $\beta$  and human chorionic gonadotropin on steroidogenesis in the rabbit corpus luteum.  
J Rep Fert 69:579-586
- 70.- KENNELLY I.I., FOOTE, R.H. (1965)  
Superovulatory response of pre- and postpubertal rabbits to commercially available gonadotropins.  
J Rep Fertil, 9:1977-1988
- 71.- KERIN , J.F., WARNES, G.M., QUINN, P, KIRBY, C., GODFREY, B., COX, L.W. (1984)  
Endocrinology of ovarian stimulation for in vitro fertilization.  
Aust N Z J Obstet Gynaecol 24:121-124
- 72.- KEUTMANN, H.T., McILROY, P.J., BERGERT, E.R., RYAN, R.J. (1983)  
Chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin subunits: characterization of biological properties.  
Biochemistry 22:3067-3072
- 73.- KHAN-DAWOOD, F.S., DAWOOD, Y. (1984)  
Implantation of the rabbit blastocyst: sequential changes in estradiol and progesterone and their receptors.  
Am J Obstet Gynecol 150:450-455
- 74.- KISTNER, R.W. (1966)  
Use of clomifene citrate, Human chorionic gonadotropin, and human menopausal gonadotropin for induction of ovulation in the human female.  
Fertil Steril 17:569-583
- 75.- KISTNER, R.W. (1976)  
Sequential use of clomifene citrate and human menopausal gonadotropin in ovulation induction.  
Fertil Steril 27:72-81
- 76.- LABARBERA, A.R., REEBAR, R.W. (1990)  
Péptidos hormonales en la reproducción: generación desintegración, recepción y acción.  
Clin Obst Gin 2:561-573
- 77.- LANZONE, A., FULGHESU, A.M., APA, R., CARUSO, A., MANCUSO, S. (1989).  
LH surge induction by GnRH agonist at the time of ovulation.  
Gynecol Endocrinol 3:213-220

- 78.- LEFEVRE, B., CAILLOT, M. (1978)  
Relationships of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbits.  
Ann Biol Anim Biophys 18:1435-1441
- 79.- LINTERN-MOORE, S., PETERS, H., MOORE, G.P.M., FABER, M. (1974)  
Follicular development in the infant human ovary.  
J Reprod Fert 39:53-64
- 80.- LITTMAN, B.A., HODGEN, G.D. (1984)  
Human menopausal gonadotropin stimulation in monkeys. Blockade of the luteinizing hormone surge by a highly transient factor.  
Fertil Steril 41:629-634
- 81.- LIU, L., SOUTHERS, J.L., BANKS, S.M., BLITHE, D.L., WEHMANN, R.E., BROWN, J.H., CHEN, H.C., NISULA, B.C. (1989).  
Stimulation of testosterone production on the Cynomolgus monkey in vivo by deglycosylated and desialylated human choriongonadotropin.  
Endocrinology 124:175-180
- 82.- LOOSFELT, H., MISRAHI, M., ATGER, M., SALESSE, R., VU HAI, M. T., JOLIVET, A., GUIOCHON-MANTEL, A., SAR, S., JALLAL, B., GARNIER, J., MILGRON, E. (1989)  
Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain.  
Science 245:525-528
- 83.- LUNENFELD, B., INSLER, V. (1978)  
En: Lunenfeld B, Inslér V editors. *Diagnosis and treatment of functional infertility*.  
Berlin: Thieme Verlag pp 76-80
- 84.- LUNENFELD, B., MENZI, A., VOLET, B. (1960)  
Clinical effects of a human postmenopausal gonadotropin.  
Rass Clin Ter Sci Affini 59:213-216
- 85.- MANJUNATH, P., SAIRAM, M.R. (1982)  
Biochemical, biological and immunological properties of chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin.  
J Biol Chem 257:7109
- 86.- MARSHALL, J.C., ANDERSON, D.C., RUSSELL FRASER, T., HARSOULIS, P. (1973)  
Human luteinizing hormone in man: studies of metabolism and biological action.  
J. Endocr 56:431-439
- 87.- MAYAN, M.D. (1982)  
Superovulación con PMSG en conejas primíparas para la obtención de embriones.  
En: Libro de Actas ITEA III Jornadas de Producción Animal pp 231-233.

- 88.- McFARLAND, K.C., SPRENGEL, R., PHILLIPS, H.S., KÖLLER, M., ROSEMBLIT, N., NIKOLICS, K., SEGALOFF, D.L., SEEBURGH, P.H. (1991).  
Lutropin-chorio-gonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family.  
Science 245:494-499
- 89.- McLEAN, M.P., MILLER, J.B. (1985)  
Steroidogenic effect of 17 $\beta$ -estradiol on rabbit luteal cells in vitro: estrogen induced maintenance of progesterone production.  
Biol Reprod 33:459-469
- 90.- McNATTY, K.P., HILLIER, S.G., BOOGAARD, A.M.J. Vd., TRIMBOSKEMPER, T.C.M., REICHERT, L.E., VAN HALL, E.E.V. (1983)  
Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle  
J Clin Endocrinol Metab 56:1022-1031
- 91.- MEIRI, U., MEIRI, H. MARSHALL, J.M. (1978)  
Effects of ovarian steroids on spontaneous and nerve-induced electrical activity of the oviducts and its attached membranes in the rabbit.  
Biol Reprod 19:183-193
- 92.- METZUK, M.M., KEEENE, J.L., BOIME, I. (1989)  
Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction.  
J Biol Chem 264:2409-2414
- 93.- MILLS, T.M., OSTEEEN, K.G. (1977)  
17 $\beta$ -Estradiol receptor and progesterone and 20 $\alpha$ -Hidroxy-4-pregnen-3-one content of the developing corpus luteum of the rabbit.  
Endocrinology 101:1744-1750
- 94.- MINEGISHI, T., NAKAMURA, K., TAKAKURA, Y., MIYAMOTO, K., HASEGAWA, Y., IBUKI, Y., IGARASHI, M. (1990)  
Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA.  
Biochem Biophys Res Commun 172:1049-1054
- 95.- MIZUNUMA, H., ANDOH, K., YAMADA, K., TAKAGI, T., KAMIJO, T., IBUKI, I. (1992)  
Prediction and prevention of ovarian hyperstimulation by monitoring endogenous luteinizing hormone release during purified follicle-stimulating hormone therapy.  
Fertil Steril 58:46-50
- 96.- MOLINA, I., PLA, M., VICENTE, J.S., MARTIN, A. AND ROMEU, A. (1991).  
Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin: comparison of oocyte and embryo quality.  
Human Reproduction 6:1449-1452

- 97.- MOLINA, I., SANTANA, A.G., PLA, M., ROMEU, A.  
Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone. Comparison with human chorionic gonadotropin.  
Human Reprod. en prensa
- 98.- MONZO, A., LOPEZ-BAENA, F., CAMPOS, J., DIEGUEZ, L., PEIRO, T., ROMEU, A. (1993)  
Pregnancies after ovarian stimulation with FSH and ovulation induction by GnRH analog administration.  
Human Reprod submitted
- 99.- NAKANO, R., MIZUNO, T., KOTSUJI, F., KATAYAMA, K., WASHIO, M., TOJO, S. (1973)  
"Triggering" of ovulation after infusion of synthetic luteinizing hormone releasing factor (LRF)  
Acta Obstet Gynec Scand 52:269-272
- 100.- NAVOT, D., BERGH, P.A., LAUFER (1992)  
Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment.  
Fertil Steril 58:249-261
- 101.- NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., EATTA, S.K. (1975)  
Rabbit ovarian follicles: isolation technique and characterization at different stages of development.  
Biol Reprod 13:423-447
- 102.- NOVAK, R.A. BAHR, J.M. 1983  
Effect of embryo removal on concentration of progesterone and LH in the rabbit.  
J. Reprod Fert 68:395-399
- 103.- OELSNER, G., SERR, D.M., MASHIACH, S., BLANKSTEIN, J., SNYDER, M., LUNENFELD, B. (1978)  
The study of induction of ovulation with menotropins: analysis of results of 1897 treatment cycles.  
Fertil Steril 30:538-544
- 104.- OSTEEEN, K.G., MILLS, T.M. (1984)  
In vivo and in vitro steroidogenic activity of post-ovulatory ovarian follicles of the rabbit.  
J. Reprod. Fert. 70:683-688
- 105.- OVERSTRÖM, E.W., BIGSBY, R.M., BLACK, D.L. (1980)  
Effects of physiological levels of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on oviduct edema and ovum transport in the rabbit.  
Biol Reprod 23:100-110

- 106.- PARSONS, T.F., PIERCE, J.G. (1980)  
Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: Bovine lutropin resist enzymatic deglycosilation because of terminal O-sulfated N-acetylexosamines.  
Proc Nat Acad Sci USA 77:7089-1093
- 107.- PARSONS, T.F., PIERCE, J.G. (1981)  
Glycoprotein hormones: Structure and function.  
Ann Rev Biochem 50:465-495
- 108.- PATTON, P.E., CALVO, F.O., FUJIMOTO, W.Y., BERGETS, E.R., KEMPERS, R.D., RYAN, R.J. (1988)  
The effect of deglycosilated human chorionic gonadotropin on corpora luteal function in healthy women.  
Fertil Steril 49:620-625
- 109.- PATTON, P.E., STOUFFER, R.L. (1991)  
Conocimientos actuales acerca del cuerpo amarillo en mujeres y primates no humanos.  
Clin Obst Gin 1:119-138
- 110.- PEINADO, J.A. (1986)  
Efecto de la FSH purificada en mujeres con enfermedad micropliquística del ovario.  
En: Tesina de Licenciatura. Universidad de Valencia Estudi General.
- 111.- PEINADO, J.A., TRESGUERRES, J.A.F. (1992)  
Nuevos conceptos acerca del papel de las gonadotropinas, FSH y LH, y de los factores locales en la estimulación ovárica.  
En: Avances en Reproducción asistida. Remohí, J., Pellicer, A., Bonilla-Musoles, F. ed. Editorial Diaz de Santos. Madrid. pp 73-85
- 112.- PELLICER, A., POLAN, M.L., DE CHERNEY. ((1992)  
La mejora de la calidad del ovocito mediante la mejora del régimen de inducción de la ovulación.  
En: Remohí, Pellicer, Bonilla Musoles ed. Avances en Reproducción Asistida. Ed. Diaz de Santos. Madrid. pp:57-71
- 113.- PLA, M. (1984)  
Categorías foliculares asociadas al comportamiento de monta en el conejo de carne.  
En: Actas del III Congreso Mundial de Cunicultura. Roma. Vol. 2:437-445
- 114.- PLA, M., MOLINA, I. (1986)  
The colour of vulva as an expresion of the level of ovarian activity in thee female rabbits.  
En: Acta del 3th International Colloquy: the rabbit as a model animal and greeding object. Rostock. pp 101-105

- 115.- **PLA, M., MOLINA, I., GARCIA, F. (1986)**  
**Relationships between the level of ovarian activity at mating and ovulation in does.**  
**En: Acta del 3th International Colloquy: the rabbit as a model animal and greeding**  
**object. Rostock. pp 95-97**
- 116.- **PUETT, DAVID (1986)**  
**Human Choriogonadotropin.**  
**BioEssays 4:70-75**
- 117.- **RAO, M.C., MIDGLEY Jr, A.R., RICHARDS, J.S. (1978)**  
**Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation.**  
**Cell 14:71-78**
- 118.- **REBOLLAR, P.G., RODRIGUEZ, J.M. DIAZ, M., UBILLA, E. (1982)**  
**Efecto de la eestimulación con PMSG sobre la respuesta ovárica y resultados de la**  
**inseminación artificial en conejas de baja receptividad sexual.**  
**En: Libro de Actas ITEA III Jornadas de Producción Animal pp 231-233.**
- 119.- **RENARD, J.P., BABINET, C. (1982)**  
**Production et congelation de l'embryon de lapin**  
**En: Libro de Actas 3emmes Jurnes de la Recherche Cunicule. Paris. Comunicación 18.**
- 120.- **RICHARDS, J.S. (1975)**  
**Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development:**  
**modification by estradiol annd gonadotropins.**  
**Endocrinology 97:1174-1184.**
- 121.- **RICHARDS, J.S. (1979)**  
**Ovarian control of ovarian follicular development: a 1978 perspective.**  
**Rec Prog Horm Res 35:343-373**
- 122.- **RICHARDSON, M.C., MASSON, G.M., SAIRAM, M.R. (1984)**  
**Inhibitory action of chemically deglycosilated-hCG on hormone-induced steroid**  
**production by dispersed cell human corpus luteum.**  
**J. Endocrinol 101:327-336.**
- 123.- **RIZK, B., ABOULGHAR, M (1991)**  
**Modern management of ovarian hyperstimulation syndrome.**  
**Human Reprod 6:1082-1087**
- 124.- **RIZK, B., SMITZ, J. (1992)**  
**Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF**  
**and related procedures.**  
**Human Reprod 7:320-327**

- 125.- RIZKALLAH, T., GURPIDE, E., WIELE, R.L.V. (1969)  
Metabolism of hCG in man.  
J Clin Endocr 29:92-100
- 126.- ROMEU, A., MONZO, A., MARTIN-CORTES, A., RODRIGUEZ INEBA, A., GONZALEZ-SANTANA, A. (1993)  
Desencadenamiento de la ovulación con un análogo agonista de la LHRH en ciclos estimulados con FSH pura. ¿Nueva indicación en la enfermedad poliquística del ovario (EPO)?  
Revista Iberoamericana de Fertilidad 10:59-63
- 127.- RYAN, R.J. Y COLS (1987)  
Structure-Function relationships of gonadotropins.  
Recen Prog Horm Res 43:383-439
- 128.- SAAL, W., GLOWANIA, H.J., HENGST, W., HAPP, J. (1991)  
Pharmacodynamics and pharmacokinetics after subcutaneous and intramuscular injection of human chorionic gonadotropin  
Fertil Steril 56:225-229
- 129.- SAFRO, E., O'NEILL, C., SAUNDERS, D.M. (1990)  
Elevated luteal phase estradiol:progesterone in mice causes implantation failures by creating a uterine environment that suppresses embryonic metabolism.  
Fertil Steril 54:1150-1153
- 130.- SAGINOR, M. and HORTON, R. (1968)  
Reflex release of gonadotropin and increase plasma testosterone concentration in male during copulation.  
Endocrinology 82:627-630
- 131.- SAIRAM, M.R. (1989)  
Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction  
FASEB J 3:1915-1926
- 132.- SAIRAM, M.R., MAJUNATH, P. (1983)  
Hormone antagonistic properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin.  
J. Biol Chem 258:445-449
- 133.- SCHENKER, J.G., WEINSTEIN, D. (1978)  
Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey.  
Fertil Steril 30:255-268
- 134.- SCHENKER, J.G. (1993).  
Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation.  
Human Reprod 8:653-659

- 135.- **SCHOEMAKER, J., WENTZ, A.C., FACOG, L., JONES, G.S., DUBIN, N.H., SAPP, K.C. (1978)**  
Stimulation of follicular growth with "pure" FSH in patients with anovulation and elevated LH levels.  
Obstet Gynecol 51:270-277
- 136.- **SCHWARTZ, M., JEWELWICZ, R., DYREENFURTH, I., TROPPER, P., WIELE, R.L. VD. (1980)**  
The use of human menopausal and chorionic gonadotropins for induction of ovulation. Sixteen years' experience at the Sloane Hospital for women.  
Am J Obstet Gynecol 138:801-807
- 137.- **SCHWARTZ, M., JEWELWICZ, R. (1981)**  
The use of gonadotropins for ovulation induction.  
Fertil Steril 35:3-12
- 138.- **SHOHAM, Z., PATEL, A., JACOBS, H.S. (1991)**  
Polycystic ovarian syndrome: safety and effectiveness of stepwise and low dose administration of purified follicle-stimulating hormone.  
Fertil Steril 55:1051-1056
- 139.- **SIMON, J.A., DANFORTH, D.R., HUTCHINSON, J.S., HODGEN, G.D. (1988)**  
Characterization of recombinant DNA derived-human LH in vitro and in vivo. Efficacy in ovulation induction and corpus luteum support.  
JAMA 259:3290-3295
- 140.- **SINGH, M.M., BOOTH, W.D. (1979)**  
Origin of oestrogen in preimplantation rabbit blastocysts.  
Journal of Steroid Biochemistry 11:723-728
- 141.- **SMITZ, J., DEVROEY, P., CAMUS, M., DESCHACHT, J., KHAN, I., STAESSEN, C. y cols (1988).**  
The luteal phase and early pregnancy after combined GnRH-agonist/hMG treatment for superovulation in IVF and GIFT.  
Hum Reprod 3:585-590
- 142.- **SURDEAU, P.H. (1982)**  
Response biologique des lapines adoptant different rythmes de productions.  
En: libro de actas 3emes journees de la recherche cunicole de Paris. Comunicación 4.
- 143.- **TAKEISHI, J.C., KAMEMIZU, H., SUGAWA, A. (1963)**  
Morfological observations on implantation of the fertilized ovum in the rabbit.  
Bull Coll Agric Nichom Univ 16:19-27
- 144.- **THIBAUDLT, C., LEVASSEUR, M.C. (1979)**  
La maturation de l'ovocyte.  
En: La fonction ovarienne chez les mammifères.  
Ed. Masson; Paris pp 35-42.



- 145.- **TORRES, S. (1977)**  
**Aspects physiologiques de la reproduction chez le lapine**  
**Cuniculture 3:139-144**
- 146.- **TSURUHARA, T., DUFAU, M.L., HICKMAN, J., CATT, K.J. (1972)**  
**Biological properties of hCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues.**  
**Endocrinology 91:296-301**
- 147.- **TSUTSUMI et al (1980).**  
**Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin F2a during egg transport in superovulated rabbits.**  
**J J Animal Rep 26:15-23**
- 148.- **TUR, R. Y GRUPO COLABORATIVO (1992)**  
**Inducción de la ovulación con FSH pura en pauta lenta, evaluación de 331 ciclos.**  
**Revista Iberoamericana de fertilidad 9:47-52**
- 149.- **VAN DAMME, M.P., ROBERTSON, D.M., DICZFALUSY, E. (1974)**  
**An improved in vitro bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse Leydig cell preparations.**  
**Acta Endocrinologica 77:655-671**
- 150.- **VAN DER MEER, S., GERRIS, J., JOOSTENS, M., TAS, B. (1993)**  
**Triggering of ovulation using a gonadotropin agonist does not prevent ovarian hyperstimulation syndrome.**  
**Human Reprod 8:1628-1631**
- 151.- **VEECK, L.L., MALONY, M. (1986)**  
**Insemination and Fertilization.**  
**En: Jones, Hodgen and Rosewaks Eds. Insemination and Fertilization. Baltimore pp:168-200**
- 152.- **VEECK, L.L. (1992)**  
**Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio FIV.**  
**En: Remohí, Pellicer, Bonilla Musoles ed. Avances en reproducción asistida. Editorial Diaz de Santos. Madrid. pp 117-161**
- 153.- **VEECK, L.L.**  
**The morphological assesment of human oocytes and early conceptuses.**  
**En: Laboratory diagnosis and treatment of infertility.**  
**CRC Press, Boca Ratón. En prensa.**
- 154.- **VENTUROLI, S., PARADISI, R., FABRI, R., MAGRINI, O., PORCU, E., FLAMIGNI, C. (1983)**  
**Comparison between human urinary follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropin treatment in polycystic ovary.**  
**Obstet Gyneecol 62:1067-1072**

- 155.- VICENTE ANTON, J.S. (1991)  
Programas de Criopreservación de Mórulas de Conejo.  
En: Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- 156.- VICENTE, J.S., GARCIA-XIMENEZ (1991)  
Effect of hCG on morula recovery in rabbit and their and their survival after asynchronus transfer.  
Anim Reprod 24:357-363
- 157.- WARD, D.N., BOUSFIELD, G.R., MAR, A.O. (1989)  
Chemical reduction-reoxidation of the glycoprotein hormone disulfide bonds.  
Serono Symposia Raven Press 65:1-17
- 158.- WILSON, C.A., LEIGHT, A.J., CHAPMAN, A.J. (1990)  
Gonadotropin glycosilation and function.  
J Endocrinol 125:3-14
- 159.- YEN, S.S.C., LLERENA, O., LITTLE, B., PEARSON, O.H. (1968)  
Dissapearance rates of endogenous LH and hCG in man.  
J Clin Endocrinol Metab 28:1763-1767
- 160.- YOO, J., ZENG, H., JI, I., MURDOCH, W.J., JI, T.H. (1993)  
COOH-terminal amino acids of the  $\alpha$  subunit play common and different roles in human chorlogonadotropin and follitropin.  
J Biol Chem 268:13034-13042
- 161.- YOSHIMURA, Y., HOSOI, Y., ATLAS, S.J., BONGIOVANNI, A.M., SANTULLI, R., WALLACH, E.E. (1986)  
The effect of ovarian steroidogenesis on ovulation and fertilizability in the in vitro perfused rabbit ovary.  
Biol Reprod 35:943-948
- 162.- YOUNGLAI, E.V. (1984)  
Effects of pregnant mare's serum gonadotropin administered in vivo on steroid accumulation by isolated rabbit ovarian follicles.  
Acta Endocrinologica 107:531-537
- 163.- YUH, K-C. M., KEYES, P.L. (1981)  
Effects of human Chorionic Gonadotropin in the rabbit corpus luteum: loss of estrogen receptor and decreased steroidogenic response to estradiol.  
Endocrinology 108:1321-1327
- 164.- YUH, K-C. M., KEYES, P.L. (1982)  
Relationships between estrogen receptor annd estradiol-stimulated progesterone synthesis in thee rabbit corpus luteum.  
Biol Reprod 27:1049-1054

- 165.- ZELINSKI-WOOTEN, M.B., HUTCHINSON, Y.A., CHANDRASEKHER, D.P.W., STOFFER, R.L.  
(1992)  
Administration of human luteinizing Hormone (hLH) to macaques after follicular  
development: further titration of LH surge requirements for ovulatory changes in  
primate follicles.  
J Clin Endocrinol Metab 75:502-507