



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA POLIVINIL PIRROLIDONA USADA
COMO COADYUVANTE CON LA HORMONA
FOLICULO ESTIMULANTE (FSH) EN EL
TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO EN VAQUILLAS
HOLSTEIN FRIESIAN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
GABRIELA RAMIREZ MAGAÑA

ASESORES: M.V.Z. ARTURO SANCHEZ ALDANA-PEREZ
M.V.Z. EVERARDO ANTA JAEN
M.V.Z. JAVIER VALENCIA MENDEZ

MEXICO, D. F.

1993



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
HIPOTESIS.....	6
OBJETIVO.....	7
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	11
CUADRO No. 1.....	13
DISCUSION.....	14
CONCLUSION.....	18
LITERATURA CITADA.....	19

RESUMEN

RAMIREZ MAGAÑA GABRIELA. Efecto de la polivinil pirrolidona usada como coadyuvante con la hormona folículo estimulante (FSH) en el tratamiento superovulatorio en vaquillas Holstein Friesian (bajo la dirección de: MVZ. Arturo Sánchez Aldana- Pérez, MVZ. Everardo Anta Jaen y MVZ. Javier Valencia Méndez).

El objetivo de este trabajo fué el de emplear un coadyuvante llamado Polivinil pirrolidona (PVP) usado con la hormona folículo estimulante (FSH) en el tratamiento superovulatorio en una sola aplicación a fin de evaluar la eficiencia en cuanto a la producción de embriones y la respuesta superovulatoria, con respecto al tratamiento superovulatorio tradicional de 4 días con dosis decrecientes de FSH-P cada 12 horas. Se utilizaron 48 vaquillas donadoras de la raza Holstein Friesian de primera recolección y se dividieron en 2 grupos: En el grupo 1, 25 vaquillas fueron tratadas con el tratamiento superovulatorio tradicional, consistente en una dosis total de 24 mg de FSH-P en dosis decrecientes cada 12 horas durante 4 días. En el grupo 2, 23 vaquillas fueron tratadas con una dosis total de 24 mg de FSH-P disuelta en 10 ml de PVP al 30% en una dosis única por vía subcutánea. La respuesta a la superovulación de las vaquillas del primer grupo (FSH-P tratamiento tradicional) fué superior a la de las vaquillas del grupo 2 (FSH-P+PVP) en el número de cuerpos lúteos: 7.6

contra 3.4; en estructuras totales recuperadas: 6.9 contra 1.7; en el promedio de embriones transferibles: 4.4 contra 0.8, y embriones no transferibles: 2.0 contra 0.5 ($P < 0.01$). No existió diferencia entre los 2 grupos en cuanto al promedio de óvulos sin fertilizar: 0.4 contra 0.3 ($P > 0.01$). Bajo las condiciones de éste estudio, la aplicación de una sola dosis de FSH-P usando como coadyuvante la polivinil pirrolidona no fué efectiva para inducir la superovulación en vaquillas Holstein Friesian.

INTRODUCCION

El principal objetivo de la transferencia de embriones es aumentar rápidamente la calidad genética de un hato, incrementando la capacidad reproductiva de los progenitores, para lo cual se seleccionan animales valiosos genéticamente (17).

En forma natural, una vaca libera un óvulo cada 21 días, y en ocasiones llega a producir dos. La técnica de transferencia de embriones se basa en la aplicación de un tratamiento superovulatorio para inducir la maduración múltiple de folículos que liberen una mayor cantidad de óvulos, que luego serán fecundados por inseminación artificial (12).

Para dicha superovulación se han empleado diversas hormonas gonadotrópicas, aunque no se ha logrado obtener un método óptimo de superovulación con el que se logre de manera constante una buena cantidad de embriones viables (25).

Las hormonas gonadotrópicas que se han utilizado para el tratamiento superovulatorio son: la Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (PMSG), la cual es un poderoso estimulante del desarrollo folicular, pero tiene la desventaja de causar una sobre-estimulación del ovario debido a su vida media tan prolongada en el torrente sanguíneo; además también provoca patrones asincrónicos de ovulación, lo que trae como consecuencia porcentajes variables de óvulos fertilizados y una tasa baja

de recuperación de embriones transferibles en cada animal recolectado (9,13). Para tratar de disminuir la actividad biológica de la PMSG se han empleado anticuerpos monoclonales contra la PMSG (anti- PMSG) durante el estro ó al momento de la inseminación artificial de las donadoras, los cuales neutralizan la actividad de la PMSG circulante; de ésta manera también se logra aumentar el número de embriones transferibles (3).

Actualmente se emplea con mayor frecuencia la FSH, misma que ha dado mejores resultados, obteniéndose un mayor número de embriones transferibles que al utilizar la PMSG (3,20).

La FSH es una hormona glicoproteica que tiene una vida media de 2 a 5 horas en el torrente sanguíneo, por lo que en la práctica es necesario aplicar dosis parciales repetidas cada 12 horas, durante 4 ó 5 días, en cantidades decrecientes y en dosis totales que van de 20 a 60 mg, para tratar de mantener niveles sanguíneos suficientes para lograr una mayor estimulación folicular (18,21,22).

Los animales sometidos a éste tipo de tratamientos repetidos son afectados por el estrés, siendo en ocasiones la causa de baja respuesta al tratamiento superovulatorio en algunos animales (22). Se han realizado trabajos tendientes a reducir al mínimo el manejo y por consiguiente el estrés utilizándose gelatina salina por vía subcutánea como vehículo para administrar una dosis única de 50 mg de FSH, aunque sin el éxito esperado en cuanto al número de embriones clasificados como transferibles, ya que hubo un alto número de em-

briones no viables (10,14,16).

Otro vehículo empleado para tratar de prolongar el efecto de la FSH, es un componente llamado Carboximetilcelulosa, el cual permite reducir el número de inyecciones, aunque no se obtuvieron resultados significativos (2,23).

La polivinil pirrolidona (PVP) es un polímero de alto peso molecular y un coadyuvante que prolonga la vida media de la FSH en el torrente sanguíneo, por lo que se ha utilizado en los tratamientos superovulatorios de vacas adultas con buenos resultados, tanto en el número total de embriones, como en el número de embriones transferibles, asimismo también se logra reducir el estrés en los animales, en comparación con las múltiples dosis del tratamiento superovulatorio tradicional (24). Sin embargo, la combinación de la PVP con la FSH no ha sido evaluada en vaquillas de la raza Holstein Friesian.

HIPOTESIS

El uso de la polivinil pirrolidona como coadyuvante de la FSH permite obtener una superovulación adecuada con una sola inyección de FSH en vaquillas de la raza Holstein Friesian.

OBJETIVO

El objetivo de éste trabajo es comparar la eficacia en cuanto a la respuesta superovulatoria y la producción de embriones del régimen de superovulación tradicional de cuatro días, consistente en la aplicación de FSH en dosis decrecientes aplicadas cada 12 horas, contra una dosis única de FSH diluida en Polivinil pirrolidona en vaquillas Holstein Friesian.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones de LICONSA, ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, ubicado en las coordenadas 19 grados, 43 minutos latitud norte y 94 grados 14 minutos longitud oeste, con una altitud de 2450 metros sobre el nivel del mar, con un clima (C(WO)b(1)) templado, subhúmedo con lluvias en verano, con una variación media de temperatura de 5 a 24 grados centígrados y una precipitación pluvial anual de 610.6 mm (7).

Se utilizaron 48 vaquillas de la raza Holstein Friesian las cuales se encontraron clínicamente sanas y sin alteraciones del aparato reproductor y ciclando normalmente, contando con una edad aproximada entre 13 y 15 meses de edad y con un peso de entre 280 a 320 Kg. Las vaquillas fueron palpadas 7 días después de detectado el calor para comprobar la presencia de un cuerpo lúteo funcional.

Se formaron 2 grupos de vaquillas donadoras de primera recolección. A los animales del grupo 1 (n=25) se les aplicó una dosis total de 24 mg de FSH-P* dividida en 8 dosis decrecientes administradas por vía intramuscular a lo largo de 4 días, comenzando entre el día 8 y 10 del ciclo estral. El primer día se aplicaron 4 mg de FSH-P en la mañana y 4 mg de FSH-P en la tarde; el segundo día se aplicaron 3 mg de FSH-P en la mañana y 3 mg en la tarde. El tercer día se apli-

*FSH-P Sheramex, S.A. de C.V. México.

caron 3 mg de FSH-P en la mañana y 3 mg en la tarde. Al cuarto día se aplicaron 2 mg de FSH-P en la mañana y 2 mg en la tarde. Además en el tercer día se aplicaron 2 ml de prostaglandina F2 alfa (Cloprostenol)** equivalente a 0.25 mg de Cloprostenol en la mañana y 0.25 mg en la tarde, por vía intramuscular.

Al grupo 2 (n=23), se le administraron 24 mg de FSH-P disueltos en 10 ml de Polivinil pirrolidona (PVP)*** al 30% en una sola aplicación por vía subcutánea en el día 8 del ciclo estral. La administración se realizó en la región de la paleta. Además los animales del grupo 2 recibieron prostaglandina F2 alfa en dosis de 0.50 mg 48 horas después de la aplicación de la FSH-P + PVP (24).

Todas las vaquillas se inseminaron 12 y 24 horas después de haberse observado en celo con una dosis de semen congelado.

La recolección de embriones se llevó a cabo 7 días después de la presentación de los signos de estro, utilizando el método transcervical no quirúrgico (1,4,6).

Posteriormente se procedió a la búsqueda y evaluación de embriones en el laboratorio, utilizando la técnica de evaluación descrita por Elsden (5).

Se evaluaron las estructuras totales y promedio de cuerpos lúteos palpados, embriones transferibles, embriones no transferibles y óvulos recolectados por grupo, así como el número

** Celosil. Ciba Geigy Mexicana S.A. de C.V México.

*** Polivinilpirrolidona. Sigma, S.A. México.

y porcentaje de animales que no produjeron embriones. Con los resultados obtenidos, se hizo un análisis estadístico descriptivo (11).

Los embriones considerados como transferibles fueron los de calidad excelente y buena, en estadios de mórula compacta, blastocito temprano, blastocito maduro y blastocito expandido. Los embriones considerados no transferibles, fueron los de calidad regular y pobre para los estadios anteriormente descritos, así como los embriones que no alcanzaron el estado de mórula compacta (8).

RESULTADOS

En el cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos con los 2 tratamientos superovulatorios.

Con lo que respecta a las vaquillas del grupo 1, los resultados obtenidos fueron superiores a los del grupo tratado con PVP en cuanto al promedio de cuerpos lúteos, que fué de 7.6 contra 3.4 del grupo 2; en cuanto al número total de estructuras, también fué superior en el grupo 1, pues se obtuvieron 174 estructuras, contra 39 correspondientes al grupo 2; el promedio de estructuras fué de 6.9 contra 1.7 del grupo 2; en cuanto a la eficiencia a la recolección, se obtuvo un 90.7% en el grupo 1 contra 50% del grupo 2; con lo que se refiere al promedio de embriones transferibles, en el grupo 1 fué de 4.4 contra 0.8 del grupo 2, es decir, 64.7% contra 48.7%; con lo que respecta al número de embriones no transferibles, en el grupo 1 se obtuvieron 52, y en el grupo 2, 12, con un promedio de 2.0 contra 0.5 del grupo 2, es decir, 29.4% y 30.7% respectivamente; finalmente en cuanto al número de óvulos, fué de 12 para el grupo 1, contra 8 del grupo 2, es decir, 5.8% contra 20.5% del grupo 2.

En cuanto a las variables analizadas, existió diferencia estadística altamente significativa entre los 2 grupos ($P < 0.01$), para el número de cuerpos lúteos palpados, número total de estructuras, número de embriones transferibles y número de embriones no transferibles. No se encontraron diferencias

en el número de óvulos no fertilizados entre los 2 grupos ($P > 0.01$).

Es importante señalar que en el grupo de vaquillas tratadas con FSH-P+PVP, la eficiencia en cuanto a la recolección de embriones fué del 50%, ya que de los 79 cuerpos lúteos palpados, solamente se obtuvieron 39 estructuras totales a la recolección, mientras que en el grupo tratado con el tratamiento tradicional con la FSH-P, la eficiencia fué del 90.7%. En cuanto al promedio de embriones transferibles, fué 4 veces superior al utilizar la aplicación convencional de FSH-P en relación al grupo tratado con PVP.

CUADRO No.1. RESPUESTA SUPEROVULATORIA DE VAQUILLAS HOLSTEIN FRIESIAN CON UN TRATAMIENTO TRADICIONAL CON FSH y CON UNA DOSIS UNICA DE FSH+PVP.

	GRUPO 1	GRUPO 2
No. Donadoras	25	23
No. C.L. totales	192	79
Promedio de C.L	7.6±0.7 (a)	3.4±0.7 (b)
No. total de estructuras	174	39
Promedio de estructuras	6.9±1.0 (a)	1.7±0.4 (b)
Eficiencia a la recolección	90.7%	50%
Promedio de embriones transferibles	4.4±0.7 (a)	0.8±0.3 (b)
% de embriones transferibles	64.7	48.7
Promedio de embriones no transferibles	2.0±0.5 (a)	0.5±0.2 (b)
% de embriones no transferibles	29.4	30.7
Promedio de óvulos	0.4±0.1 (a)	0.3±0.1 (a)
% de óvulos	5.8	20.5

** Valores con diferente literal, indican diferencia estadística significativa ($P < 0.01$).

DISCUSION

En el presente trabajo al aplicar el régimen superovulatorio de FSH+PVP en vaquillas de la raza Holstein Friesian se obtuvo un promedio de 0.8 embriones transferibles (48.7%), lo cual difiere de los resultados obtenidos por Yamamoto y col. (24), que al utilizar el mismo vehículo con la FSH obtuvieron en promedio 7.7 (76.5%) embriones transferibles. Las diferencias entre los dos trabajos, posiblemente se deban a que en éste último trabajo, se utilizaron vacas adultas de la raza Black Japanese, tomando en cuenta que los resultados obtenidos en los tratamientos superovulatorios pueden verse afectados por factores como la raza y edad, entre otros (25). Otro factor de diferencia, posiblemente se deba a la dosis total de FSH utilizada por Yamamoto y col. (24) que fué de 30 mg, y en éste trabajo se utilizaron 24 mg, ya que con ésta cantidad se han obtenido resultados favorables en el tratamiento superovulatorio en vaquillas Holstein de primera recolección.

Hill y col. (10) utilizaron la gelatina salina como vehículo de la FSH, para reducir a una sola la inyección en el tratamiento superovulatorio. Los resultados obtenidos en cuanto al promedio de embriones transferibles fué de 3.7 (61.6%) lo cual se acerca un poco más a los resultados obtenidos en éste trabajo, aunque el vehículo sea distinto.

En cuanto al número de cuerpos lúteos totales utilizando

gelatina salina (10), el promedio fué de 17.3, mientras que el promedio de cuerpos lúteos fué de 3.4 en el presente trabajo.

Chupin y col. (2) utilizaron una sola inyección de Carboximetilcelulosa + FSH en el tratamiento superovulatorio con una dosificación de 25 mg, el promedio de cuerpos lúteos fué de 6.2, y el promedio de embriones transferibles fué de 2.0, y al disminuir la frecuencia de las inyecciones a 1 cada 2 días, con una dosis total de 32 mg, obtuvieron un promedio de 2.5 cuerpos lúteos y 0.6 embriones transferibles, lo cual nos indica que el resultado no fué favorable, al igual que ocurrió con los resultados del presente trabajo al tratar de reducir el número de inyecciones, utilizando como vehículo la polivinil pirrolidona.

Por otro lado, Looney y col. (14) aplicaron una dosis diaria de 10 mg de FSH por 5 días, en una sola inyección utilizando como vehículo la gelatina. Los resultados obtenidos en cuanto al promedio de cuerpos lúteos fué de 8.1, y 3.3 en cuanto al promedio de embriones transferibles, es decir, fueron superiores en comparación con el grupo control a cuyos animales no se les aplicó el vehículo, obteniendo así un promedio de cuerpos lúteos de 6.4 y de embriones transferibles de 3.1. En éste caso tuvo éxito el tratar de reducir las inyecciones de FSH con el vehículo, pero de cualquier manera, el número de inyecciones fué de 5, a diferencia de lo que se busca en el presente trabajo, pero indica de cualquier forma una manera para ir disminuyendo el manejo de los animales.

Screenan y col. (19) han investigado las posibles causas por las que se presenta un menor número de ovulaciones en el tratamiento superovulatorio, encontrando que quizá se deba a que los ovarios aumentan mucho de tamaño como respuesta a la superovulación, lo cual representa dificultades mecánicas en el transporte de los ovocitos através de la fimbria y ésto hace que el número de embriones recuperados se vea disminuido. Posiblemente la dosis total de FSH+PVP en una sola aplicación, influyó para la presentación de éstas alteraciones en forma más determinante, es decir, que el problema pudo haber aumentado por acción de la PVP.

Con lo que respecta al número de óvulos fertilizados, resultó ser menor en el tratamiento superovulatorio de FSH+PVP que en el tratamiento superovulatorio tradicional, posiblemente debido a la alta producción de progesterona por parte de las células luteínicas. Maurer y col. (15) encontraron que éstos niveles altos pueden alterar el transporte de óvulos, ovocitos y espermatozoides en los oviductos, y de ésta manera verse disminuída la tasa de fertilización; además de la hemorragia producida por el alto número de ovulaciones y al estrés ocasionado en el tracto reproductivo, lo cual puede alterar también la ovulación normal y por lo tanto la fertilización, además de los cambios hormonales tan drásticos, principalmente en las hormonas esteroides, las cuales pueden alterar la capacitación de los espermatozoides, la fecundación, y el transporte de gametos y embriones. Todas éstas

alteraciones se llegan a presentar en el tratamiento superovulatorio tradicional, pero posiblemente aumentaron en éste caso, en el que se utilizó un vehículo junto con la dosis total de FSH, como ya se mencionó.

No existen muchos trabajos en donde se haya utilizado la PVP en el tratamiento superovulatorio, por lo que todavía se tiene que hacer más investigación y evaluaciones al respecto para ver otros resultados.

CONCLUSION

En éste estudio se utilizó FSH-P + PVP, observándose en los resultados que se produce una mayor respuesta superovulatoria al utilizar la FSH-P sin el uso de la PVP; aunque también existen otros trabajos en los cuales el uso de la PVP como coadyuvante resulta efectivo, tanto en la respuesta superovulatoria como en el promedio de embriones transferibles por vaca.

El uso de coadyuvantes en el tratamiento superovulatorio no ha sido muy estudiado, por lo que se debe hacer una investigación más extensa en cuanto a ésto para poder determinar las causas de la variación en la producción y calidad de los embriones producidos.

LITERATURA CITADA

- 1.- Brand, A., Trouson, A.O., Aarts, M.H., Drost, M. and Zoayer, D. : Superovulation and non surgical embryo recovery in the lactating dairy cow. Anim. Prod. 26: 55-60 (1978).
- 2.- Chupin, D.Y. and Procurer, R.P.: Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle. Animal Reproduction Science 6: 11-23 (1988).
- 3.- Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A., Gelden, J.Y. and Willems A.H. : Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cow after PMSG superovulation with monoclonal anti PMSG administered shortly after the pre-ovulatory LH peak. Theriogenology 31 : 473-486 (1989).
- 4.- Drost, M., Brand, A. and Aart, M.H. : A device for non-surgical recovery of bovine embryos. Theriogenology 6: 503-507 (1976).
- 5.- Elsdén, R.P. Y Seidel, G.P. Jr.: Procedimientos para la recolección, división, congelación y transferencia de embriones de bovino. Laboratorio de Reproducción Animal Colorado State University of Collins, Colorado U.S.A. (1986).
- 6.- Elsdén, R.P., Hasler, J.F. and Seidel, G.E., Jr. : Non-surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology 6 : 523-532 (1976).
- 7.- García, E. : Modificación al sistema de clasificación climática de Kopen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., (1972).

- 8.- Gary, M., Linder and Raymond, W., Wright, Jr. : Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20: 4 (1983).
- 9.- Hasler, J.F., Mc Cauley, A.D., Schermenhorn, E.C. and Foote, R.H. : Superovulatory responses of Holstein cows. Theriogenology 19: 83-99 (1983).
- 10.- Hill, K.G., Mc Farland, C.W., Rorie, R.W., Viker, S.D. and Godke, R.A. : A single 50 mg injection of follicle stimulating hormone (FSH) for superovulation of embryo donor cattle. Theriogenology 23 : 196 (1985).
- 11.- Infante, G y Zárate, L. : Métodos Estadísticos. Ed. Trillas, México, D.F. 1984. P. 221-224 y 404-412.
- 12.-Lars, G. CH. : Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. Theriogenology 35 : 141-149 (1991).
- 13.- Laster, D.B. : Ovulation, fertility and prenatal mortality in heifers treated with PMSG or porcine FSH. J.Reprod Fert. 33 : 275-282 (1973).
- 14.- Looney, R., Boutte, B.W., Archhald, L.F. and Godke, R.A.: Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. Theriogenology 15 : 13-22 (1981).
- 15.- Maurer, R.R. and Echterkamp, S.E. : Hormonal asynchrony and embrionic development. Theriogenology 17 : 11-22 (1982).
- 16.- Page, R.D., Jordan, J.E. and Johnson, S.K. : Superovulation in Holstein heifers under heat stress with FSH-P or folltropin. Theriogenology 31 : 236 (1989).

- 17.- Pashen, R. : Embryo transfer: applications and implications for the future. California Veterinarian 42 : 11-13 (1988).
- 18.- Santos, S., Sánchez, A.P. y Monterrubio, S.G. : Superovulación en ganado bovino empleando hormona folículo estimulante a diferentes dosis. INIP-SARH VII congreso nacional de buiatría 256-259 (1982).
- 19.- Screenan, J.M., Beehan, P. and Mulvehil, P. : Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfer. J. Reprod. Fert. 44 : 77-85 (1975).
- 20.- Sleening, D.B. and Wheeler, M.B. : Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer stimulations and economic decision theory. Theriogenology 31 : 653-673 (1989).
- 21.- Sumano, H. y Ocampo, C.L., : Farmacología Veterinaria. Mc. Graw Hill. México, D.F. 521-532 (1988).
- 22.- Takahashi, Y. and Kanagawa, H. : Inductions of superovulations using several FSH regimens in Holstein Friesian heifers. Jnp. J. Vet. Res. 33:45-50 (1985).
- 23.- Voss, H.J., Allen, S.E., Foote, R.H., Im, P., Kim, C.K. and Aquadro, P. : Buserelin in a superovulatory regimen for Holstein cows. 1: Pituitary and ovarian hormone response in an experimental herd. Theriogenology 31 : 371-384 (1989).
- 24.- Yamamoto, M., Suzuki, T., Ooe, M., Takagi, M. and Kawaguchi, M. : Efficacy of single vs. multiple injection

superovulation regimens of FSH using polyvinylpyrrolidone. Theriogenology 37: 325 (1992).

- 25.- Zarco, L. : Algunos factores que afectan los resultados de la superovulación en el ganado bovino. Memorias del III curso internacional de reproducción bovina. Academia de investigación en biología de la reproducción A.C. México, D.F., F.M.V.Z. U.N.A.M. : 107-118 (1990).