

## La buserelina en programas de superovulación para transferencia de embriones

Dora C Suárez,<sup>1</sup> MV; María T Gaviria,<sup>2</sup> MV, MS, Carlos J Gómez,<sup>3</sup> MV

<sup>1</sup> Ejercicio particular.

<sup>2</sup> Programa de Biogenesis, Grupo de Fisiología y Biotecnología, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia\*

<sup>3</sup> Alta Ltda, AA 103128 Bogotá

(Recibido: 6 marzo, 2001; aceptado: 24 mayo, 2001)

### Resumen

*El objetivo de éste trabajo fue comparar la respuesta superovulatoria y la cantidad y calidad de embriones recuperados en vacas Holstein en la Sabana de Bogotá, mediante la aplicación de buserelina en el día 6 del ciclo estral, antes de iniciar el esquema de superovulación. El trabajo se realizó en la Sabana de Bogotá, a 2640 msnm y una temperatura promedio de 12° C. Se emplearon veinte bovinos hembra de la raza Holstein a los cuales se les aplicó FSH (Vetrepharm Inc, Ontario, Canadá) para inducir superovulación, en los días 11, 12 13 y 14 del ciclo estral, con una dosis total de 20 cc, y PGF<sub>2α</sub> (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) con la última dosis de FSH, 3 cc im. A diez de ellas (grupo tratamiento) se les aplicó Buserelina (Hoechst Roussel Vet, München, Alemania) en el día 6 del ciclo estral, antes de iniciar el tratamiento superovulatorio. Las diez vacas restantes se consideraron como grupo control. Los resultados obtenidos muestran que hubo diferencia significativa entre el grupo tratamiento y el grupo control respecto a la respuesta superovulatoria ( $p < 0,05$ ) No se encontró diferencia significativa en el número de embriones recuperados en ambos grupos ( $p > 0,05$ ).*

**Palabras clave:** análogos de GnRH, folículo dominante, superovulación, vaca.

### Introducción

La vaca es un animal poliéstrico (13) y monovular (3). La longitud del ciclo estral varía entre 18 y 24 días (13) siendo el promedio 21 días. En general la duración del estro es de 12 a 18 horas y la ovulación ocurre aproximadamente 30 horas después de iniciado el estro (13).

El número de oocitos presentes al nacimiento es el disponible para el desarrollo durante la vida reproductiva. La multiplicación oogonial en el feto comienza cerca del día 50 de gestación; el proceso de pérdida de oogonias comienza hacia el día 55 de gestación (20). Hacia el día 86 de la gestación, los oocitos inician la primera división meiótica y son retenidos en un estado de profase meiótica (20).

Cada oocito es rodeado por células nodriza, en una estructura denominada folículo (26). La formación de folículos primordiales comienza durante la vida prenatal (16).

El ingreso de los folículos primordiales en el proceso de crecimiento y diferenciación representa un compromiso irreversible para cada folículo, que lo conduce a dos posibilidades: desarrollo hasta llegar a la ovulación, o atresia. De acuerdo con el tamaño de los folículos, se han establecido las siguientes categorías: Pequeños: 2 – 4 mm, Medianos: 5 – 9 mm, Grandes: >10 mm (23).

En la vaca y la oveja la foliculogénesis se puede dividir en dos componentes: foliculogénesis basal, la cual puede originarse, por lo menos parcialmente, en

ausencia de gonadotropinas, y foliculogenesis tónica, la cual requiere de gonadotropinas y comienza cuando los folículos miden cerca de 4 mm en la vaca (9). El desarrollo folicular en la vaca es una secuencia dinámica de eventos organizados, los cuales se pueden describir como una onda (5). Estas ondas ocurren en la prepubertad, postparto y durante el ciclo estral (20 y 25, citados por 19).

El desarrollo de una onda folicular está caracterizado por el crecimiento sincronizado de un número de folículos de 4-5 mm de diámetro, seguido por selección del folículo dominante y regresión de los folículos subordinados (15, citado por 4). El monitoreo de estructuras ováricas mediante ultrasonografía transrectal ha demostrado que el desarrollo folicular ocurre en dos o tres ondas durante el ciclo estral bovino. En cada onda un grupo de folículos empieza a desarrollarse y eventualmente un folículo llega a ser dominante, mientras que los demás sufren atresia. En ausencia de regresión luteal, el folículo dominante regresa, y una nueva onda folicular comienza. (17). Esta secuencia ocurre aproximadamente cada diez días (20, citado por 19). Cuando la regresión luteal ocurre, una oleada preovulatoria de gonadotropinas causa la ovulación del folículo dominante (16). Se ha demostrado que el momento en que se selecciona el folículo dominante coincide con una disminución significativa en las concentraciones de FSH (1, citado por 3 y 4); y el desarrollo de la onda folicular está precedido por un incremento en las concentraciones de FSH, uno o dos días antes (1, citado por 4).

El folículo dominante puede inhibir el desarrollo folicular. Así, no aparece una nueva onda de maduración folicular, cuando el folículo dominante esté presente en fase estática temprana o en fase decreciente (15, citado por 16). El folículo dominante causa la regresión de los folículos subordinados (2), ya que parece inhibirlos al no permitir un adecuado soporte gonadotrópico (9). Esta inhibición puede ser pasiva mediante la supresión de las concentraciones plasmáticas de FSH, y/o activa, por medio de la reducción de la sensibilidad a la FSH. El folículo dominante incrementa su tamaño desde 6 hasta 20 mm de diámetro (9,18). Para el comienzo del crecimiento se requiere un incremento de las concentraciones de FSH y pulsos de LH (28, citados por 31). Los niveles de FSH incrementan cuando el folículo dominante pierde la dominancia, con lo cual comienza el desarrollo de una nueva onda (6).

El objetivo de los tratamientos superovulatorios en la hembra bovina es obtener el máximo número de embriones fertilizados y transferibles con una alta posibilidad de producir una preñez (17). Con los tratamientos superovulatorios se estimula el crecimiento y subsiguiente ovulación de los folículos antrales y se previene la atresia folicular (2,20). La variación en la respuesta a la superovulación está relacionada con causas tales como la preparación gonadotrópica, la cantidad de gonadotropina, la duración del tratamiento, el momento del tratamiento respecto al ciclo estral, la dosis total de gonadotropina y el uso de hormonas adicionales en el esquema superovulatorio (17, 20).

Otros factores referentes al animal y al ambiente, tales como estado nutricional, historia reproductiva, condición de los ovarios en el momento del tratamiento, edad, raza, etc, afectan la respuesta superovulatoria. Adicionalmente la superovulación repetida afecta la respuesta superovulatoria (17). Se ha reportado una disminución en el número de ovulaciones cuando el tratamiento superovulatorio se inicia en presencia de un folículo dominante (21).

El estado de desarrollo de la onda folicular es responsable en gran parte de la variabilidad en la respuesta ovárica a los tratamientos superovulatorios y el intervalo del tratamiento con  $PGF_{2a}$  respecto al estro (16). Se sugiere que la superovulación será inducida de manera eficaz cuando el tratamiento se inicia durante la primera o segunda onda folicular, y que la respuesta superovulatoria es mejor cuando el tratamiento se inicia en el tiempo de desarrollo de la onda, antes de la selección del folículo dominante (2). Esto con el fin de evitar el efecto negativo del folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria. La FSH exógena es utilizada en programas de superovulación para transferencia de embriones en diferentes esquemas de aplicación a partir del día 8 del ciclo estral. La respuesta es altamente variable (3).

La GnRH es un decapeptido con peso molecular de 1138 daltons; es sintetizada en el hipotálamo, y modula la síntesis y secreción de LH y FSH por las células secretoras de la adenohipófisis. La GnRH exógena puede ser utilizada para promover la actividad ovárica y ovulación en vacas postparto acíclicas (8). Se ha empleado también para mejorar la tasa de fertilización (34); para recuperar la actividad ovárica en vacas con síndrome de ovarios quísticos y en la

inducción de la ovulación en vacas de leche tratadas en las dos semanas posteriores al parto (10).

Los análogos agonistas de la GnRH inducen la liberación de LH y FSH de manera similar a como lo hace la GnRH natural (7). La actividad biológica de los análogos de la GnRH es mayor que la de la hormona natural (27). Los agonistas GnRH parecen ser capaces de regular la dinámica folicular al causar un efecto luteínico (29). La buserelina es un análogo agonista potente de la GnRH. Se ha reportado, al examen ultrasonográfico, la desaparición de folículos grandes por atresia y/o luteinización después de la administración de buserelina (29, citados por 30). La disminución en el conjunto de grandes folículos después de la administración de buserelina fue asociada con un incremento transitorio en el número de folículos de 4 a 6 mm y de 7 a 9 mm (30). Se reporta que la buserelina aplicada en el día 12 del ciclo estral ocasiona una alteración en la distribución folicular, al elevar el número de folículos ecogénicos al examinarlos mediante ultrasonografía, lo cual posiblemente representa algún grado de luteinización o atresia.

El objetivo de éste trabajo fue comparar la respuesta superovulatoria y la cantidad y calidad de embriones recuperados en vacas Holstein en la Sabana de Bogotá, mediante la aplicación de buserelina en el día 6 del ciclo estral, antes de iniciar el esquema de superovulación, en el momento en que existe un folículo dominante.

### Materiales y métodos

Se trabajaron veinte (20) bovinos hembra de raza Holstein (vacas entre 3 y 7 años de edad, novillas de 2 años de edad) pertenecientes a un programa de superovulación a nivel comercial. Estos animales se localizaron en fincas en la Sabana de Bogotá (2640 msnm, 12°C de temperatura promedio). Presentaban ciclos estrales normales. Fueron alimentadas con forraje verde de alta calidad, (ryegrass *Lolium spp*, Kikuyo *Pennisetum clandestinum*,) concentrado comercial y afrecho de cervecería, y mantenidas en adecuadas condiciones sanitarias. El trabajo fue llevado a cabo entre Agosto de 1996 y Abril de 1997.

Se conformó un grupo control (C, n=10) y un grupo tratamiento (T, n=10).

### Superovulación

Al grupo C se le administró FSH (Vetrepharm, Canadá Inc, Ontario, Canadá) en dosis descendentes desde el día 11 a 14 del ciclo estral (estro = día 0, fecha que se tomó como "calor de referencia"), así:

Día 11	4 cc i.m., b.i.d.,	equivalente 80 mg en cada aplicación
Día 12	3 cc i.m., b.i.d.,	equivalente a 60 mg en cada aplicación
Día 13	2 cc i.m., b.i.d.,	equivalente a 40 mg en cada aplicación
Día 14	1 cc i.m., b.i.d.	equivalente a 20 mg en cada aplicación

y dinoprost trometamina (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) el día 14, 3 cc (15 mg) i.m., al mismo tiempo que la FSH.

Al grupo T se le administró igual tratamiento, después de la aplicación de 8 mg de buserelina (Hoechst Roussel Vet, München, Alemania), i.m. el día 6 del ciclo estral, antes de iniciar el tratamiento superovulatorio.

### Inseminación artificial

Las hembras fueron inseminadas en tres oportunidades, cada 8 horas, a la presentación del celo.

### Recuperación de embriones

Al día 7 después del calor de referencia las vacas fueron examinadas mediante palpación rectal por una misma persona, con el fin de determinar el número de cuerpos lúteos en cada ovario. Posteriormente se realizó la recuperación de los embriones por el método transcervical no quirúrgico. Se efectuó una anestesia epidural con 5 cc de lidocaína al 2 % (Synthesis, Bogotá, Colombia), se introdujo a través del cervix una sonda de Foley y se conectó a un sistema de dos vías a través del cual se introdujo un litro de medio de lavado (PBS, Minitube, Landshut, Alemania). Los embriones obtenidos en éste medio recuperado fueron evaluados y calificados (10). Los embriones de grado 1 y 2 fueron congelados en pajillas individuales en medio VIGRO (Minitube, Landshut, Alemania) con etilenglicol como crioprotector.

### Análisis estadístico

Los animales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los grupos (T y C) en un diseño completamente al azar, tomando como variables el número

de cuerpos lúteos y el número de embriones aptos para congelación (Grados 1 y 2). Los resultados fueron analizados mediante Análisis de Varianza, con un nivel de significancia del 5 %. El modelo matemático para éste diseño fue:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = es la variable dependiente para el animal en el tratamiento  $i$  (número de cuerpos lúteos, número de embriones)

$j$ : 1,2,3,.....10.

$T_i$ : tratamiento (1,2)

$m$ : media general del grupo

$e_{ij}$ : error aleatorio

### Resultados

- Cuerpos lúteos: en el grupo control se obtuvo un promedio de 8,5 +/- 3,05 cuerpos lúteos (ESM = 0,38). En el grupo tratamiento el valor obtenido fue de 10,2 +/- 0,98 cuerpos lúteos (ESM = 0,33). Ver Tabla 1.
- Embriones recuperados: en el grupo control se obtuvo un promedio de 9,01 +/- 6,05 embriones (ESM = 0,76). En el grupo tratamiento el valor obtenido fue de 9 +/- 2,36 embriones (ESM = 0,79). Ver Tabla 2.

### Discusión

La variabilidad en la respuesta superovulatoria disminuyó al aplicar el análogo de GnRH, mostrando diferencia significativa entre las vacas tratadas y las vacas control. Con relación al número de embriones transferibles, el resultado obtenido no fue significativamente diferente entre el grupo control y el grupo tratamiento.

La aplicación de un análogo de GnRH causa luteinización o atresia de los folículos grandes existentes en el ovario, y una nueva onda de folículos es reclutada en pocos días. Esto permite sincronizar estros con mayor precisión ya que se suprime el efecto del folículo dominante. La desaparición de los folículos grandes se evidencia ultrasonográficamente como la presencia de un aspecto turbio en el interior de los folículos, y la posterior desaparición de los mismos (32). La detección de una nueva onda se ha hecho tres días después de la aplicación de la GnRH. Esto permitiría, en éste caso, que, al aplicar la GnRH, se suprima la actividad del folículo dominante presente el día 6 del ciclo estral y tener una nueva onda de folículos al día 9, la cual va a ser utilizada en el proceso superovulatorio, y en la cual no hay presencia de folículo dominante. Si la dominancia resulta de la acción directa del folículo dominante sobre los folículos subordinados, entonces un régimen superovulatorio sería más exitoso si se comienza al inicio de la onda de maduración folicular, en ausencia del folículo dominante. Wolfsdorf et al. inten-

**Tabla 1.** Tabla de Análisis de Varianza para los cuerpos lúteos obtenidos en las vacas tratadas y no tratadas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Valor F tablas
Tratamientos	1	42.42	42.42	5.11 <sup>a</sup>	3.9
Error	67	555.23	8.28		
Total	68	597.65			

*a*: P < 0.05

**Tabla 2.** Tabla de Análisis de Varianza para total de embriones recuperados en las vacas tratadas y no tratadas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Valor F tablas
Tratamientos	1	0.00138	0.00138	0.00004 <sup>b</sup>	3.98
Error	67	2300.984	34.34		
Total	68	2300.98			

*b*: P > 0.05

taron establecer el efecto del folículo dominante sobre la cantidad de embriones obtenidos después de un tratamiento superovulatorio, y encontraron que aunque no fue posible hallar diferencia significativa en el número de embriones obtenidos o en la calidad de los mismos entre vacas con tratamiento superovulatorio normal y vacas con aspiración del folículo dominante al día 6, y superovuladas desde el día 8, si hubo importantes modificaciones en la dinámica folicular en el grupo tratado (aspiración del folículo dominante): se evidenció un incremento en el número de folículos pequeños y un mayor reclutamiento de folículos medianos y grandes en respuesta al tratamiento superovulatorio (33). La interferencia del folículo dominante con el procedimiento superovulatorio se ha observado como la ovulación prematura de éste folículo y su posterior luteinización, más que como supresión del reclutamiento de nuevos folículos. Esta luteinización ocasiona, debido a la producción de progesterona y a la insensibilidad a la aplicación de prostaglandina dentro del esquema superovulatorio, un ambiente inadecuado para la generación de una oleada preovulatoria, y por lo tanto, perturba la ovulación de los folículos madurados bajo el efecto del tratamiento superovulatorio. Esto explica en parte el fracaso de dichos tratamientos. Sin embargo, este efecto de ovulación y luteinización prematura no se observó en todos los casos en que se inició el tratamiento en presencia de un folículo dominante (28).

En el presente trabajo no se pudo contar con la ayuda de la ultrasonografía transrectal para monitorear efectivamente el efecto del tratamiento con GnRH en las vacas tratadas. Sin embargo, la diferencia significativa hallada en el número de cuerpos lúteos detectados indica que si se generó algún cambio en el proceso de maduración folicular, el cual permitió la maduración de un mayor número de folículos.

En cuanto al número de embriones, transferibles o aptos para ser congelados obtenidos en éste trabajo, no hay diferencia significativa entre las vacas tratadas y las no tratadas. Esta circunstancia puede obedecer a varias causas:

- fallas en la ovulación de los folículos madurados, los cuales pueden haber sufrido luteinización. No era posible, con los medios disponibles en el momento, detectar este hecho.
- fallas en la fertilización. No se tuvo en cuenta, ya que el objetivo era determinar diferencia en el número de embriones aptos para ser transferidos o

congelados. Sin embargo, Wolfsdorf et al. no encontraron diferencia en el número de óvulos no fertilizados al hacer aspiración del folículo dominante el día 6. El número de óvulos no fertilizados o la ausencia completa de fertilización continúa siendo un factor limitante en los procedimientos de superovulación. Esto ha sido atribuido a anomalías en la maduración del oocito, a asincronía entre los eventos de maduración del oocito y del folículo, o al momento de la ovulación (3). Otras anomalías, de tipo endocrino, pueden afectar la tasa de fertilización, o pueden ocasionar alteraciones en el oviducto, en el medio uterino, o provocar un tono uterino inadecuado (3).

- fallas en el transporte de los óvulos y/o embriones a través del oviducto: en general, no todos los embriones son recuperados mediante métodos de recolección no quirúrgicos, sea por variación individual del animal o por eficiencia variable en el método de recolección (33). Los embriones de vacas superovuladas sufren un transporte extremadamente desorganizado a través del oviducto, muy posiblemente debido a la temprana luteinización de los folículos y al incremento concomitante en los niveles de progesterona, lo cual altera la actividad contráctil del oviducto, acelerando el paso de los embriones hasta el útero (11). La acción de las hormonas periféricas sobre el oviducto es mediada a través de un red de factores locales específicos del tipo celular y del momento del ciclo. La presencia de factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y del sistema adrenérgico modifica los sistemas de regulación autocrina y paracrina presentes en el oviducto, los cuales actúan para permitir la fertilización y la embriogénesis temprana (12). Recientemente se ha encontrado que hay receptores de LH a nivel del oviducto porcino, y durante la fase folicular temprana y el período periovulatorio la estimulación de éstos receptores modifica la actividad contráctil a nivel del istmo y del ampulla, disminuyendo la amplitud y frecuencia de las contracciones. Este efecto no fue observado en la fase luteal. Así, la LH puede ser un factor mayor en la sincronización de los eventos previos a la fertilización tales como el transporte de espermatozoides y el transporte del óvulo hasta el ampulla, y posteriormente a través del istmo (14). Al modificar la dinámica ovárica, se está modificando indirectamente el complejo entorno oviductal, y estas modificaciones tienen efecto deletéreo sobre la fertilización,

el desarrollo embrionario temprano y el momento de llegada del embrión al útero, lo cual también afectará la supervivencia embrionaria.

La aplicación de un análogo de GnRH reprograma y sincroniza el desarrollo folicular (22). Esta reprogramación, utilizada por los autores mencionados para sincronización de celos en aplicación doble,

combinada con prostaglandina, resultó en la desaparición del folículo dominante y en el desarrollo de una nueva onda de maduración folicular, sincrónica en todos los animales tratados. Esto aplicado o a vacas superovuladas, tanto como a las receptoras, garantizaría un mejor ambiente para los embriones, con lo cual se incrementaría la supervivencia de los mismos.

### Summary

#### *Buserelin in superovulation programs for embryo transfer*

*The aim of this work was to compare the superovulatory response and the quantity and quality of recovered embryos in Holstein cows at the Sabana de Bogotá, through the application of buserelin at day 6 of the oestrus cycle, before starting the superovulatory treatment. The work was performed at the Sabana de Bogotá, at 2640 mosl, with an average temperature of 12 °C. 20 female bovines of Holstein breed were injected with FSH (Vetrepharm Inc, Ontario, Ccanada) to induce superovulation at days 11,12,13,and 14 of oestrus cycle, using a total dose of 20 cc per cow, and 3 cc of PGF<sub>2a</sub> (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) with the last dose of FSH. Ten cows (treatment group) received buserelin (Hoechst Roussel Vet, München, Alemania) on day 6 of estrous cycle, before starting superovulatory treatment. The remaining ten cows were considered as control group. The results show significant difference between treatment and control group regarding superovulatory response ( $p < 0,05$ ). It was not found a significant difference between treatment and control group regarding the number of recovered embryos ( $p > 0,05$ ).*

**Key words:** GnRH analog, dominant follicle, superovulation, cow.

### Referencias

- Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effects of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *J Anim Sci* 1993; 73:267-275.
- Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superovulation. *Theriogenol* 1994; 41:19-24.
- Adams GP, Pierson RA. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenol* 1995; 43:113-120.
- Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenol* 1993; 39:7-24.
- Bo GA, Adams GP. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenol* 1995; 43:31-40.
- Bodensteiner K, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenol* 1996; 45:1115-1128.
- Chenault JR, Kratzer, DD, Rezkowsky RA, Goodwin MC. LH and FSH response of holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenol* 1990; 34:81-98.
- D'Occhio MJ, Gifford DR, Earl CR, Weatherly T, Rechenberg, W. Pituitary and ovarian responses of postpartum acyclic beef cows to continuous long-term GnRH an GnRH-agonist treatment. *J Reprod Fert* 1989; 85:495-502.
- Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenol* 1991; 35:55-79.
- Drost M. Training manual for embryo transfer in cattle. University of Florida, 1993.
- Ellington JE. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of literature. *Cornell Vet* 1991; 81:313-328.
- Einspanier R, Kettler A, Gabler C, Kloas W, Einspanier A, Schams D. The mammalian oviduct: aspects of auto- and paracrine mechanisms. *Reprod Dom Anim* 2000; 35:125-128.
- Garverick HA, Smith MF. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin Of NA: food animal practice* 1993; 9:223-247.
- Gawroska B, Stpien A, Ziecik AJ. Role of luteinizing hormone in control of oviduct function. *Reprod Dom Anim* 2000; 35:129-133.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 1989; 87:223-230.
- Kastelic J. Understanding follicular development in cattle. *Vet Med* 1994; 89:64-71.

17. Mapletoft RJ, Bo GA, Pierson RA. Recruitment of follicles for superovulation. *The Compendium* 1994; 16: 127-142.
18. Martin TL, Fogwell R, Ireland JJ. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 1991; 44: 693-700.
19. McDougall S, Burke CR, McMillan KL. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Res Vet Sci* 1995; 58:212-226.
20. Murphy B, Lindsell c, LI X. Endogenous inhibitors of Follicle development. *Joint FAO-IAEA division*; 1994. 1-4.
21. Nasser LF, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergency in heifers. *Theriogenol* 1993; 40:713-724.
22. Peters AR, Ward SJ, Warren MJ, Gordon PJ, Mann GE, Webb R. Ovarian and hormonal responses of cows to treatment with an analogue of gonadotrophin releasing hormone and prostaglandin F<sub>2a</sub>. *Vet Rec* 1999; 144:343-346.
23. Purwantara B, Schmith M, Grevet T, Callesen L. Follicular dynamics prior to and during superovulation in heifers. *Theriogenol* 1993; 40:913-921.
24. Rouillier P, Guilbault L, Lussier J, Matton P. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence and absence of a dominant follicle. *Theriogenol* 1996; 46:1053-1061.
25. Savio JD, Bongers H, Drost M, Lucy MC, Tatcher WW. Follicular dynamics and superovulatory response in holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. *Theriogenol* 1991; 35:915-929.
26. Seidel Jr G, Elsdon RP. Embryo transfer in dairy cattle. *Hoard's dairyman* 1989:234-237.
27. Sheldon JM, Dobson H. Effects of gonadotrophin releasing hormone administered 11 days after insemination on the pregnancy rates of cattle to the first and later services. *Vet Rec* 1993; 133:160-163.
28. Stock AE, Ellington JE, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenol* 1996; 45:1091-1102.
29. Tatcher WW, McMillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenol* 1989; 31:149-164.
30. Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Villeneuve P, Dufour JJ. Influence of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (buserelin) on oestrus synchronization and fertility in beef cows. *J Anim Sci* 1992; 70:1904-1910.
31. Webb R, Gong JG, Bramley TA. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenol* 1994; 41:25-30.
32. Wolfenson D, Tatcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC. The effect of a GnRH analogue on the follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. *Theriogenol* 1994; 42:633-644.
33. Wolfsdorf KE, Diaz TE, Schmitt EJP, Tatcher MJ, Drost M, Tatcher WW. The dominant follicle exerts and interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenol* 1997; 48:435-447.
34. Wubishet A, Kesler DJ, Graves CN. Preovulatory LH profiles of superovulated cows and progesterone concentrations at embryo recovery. *Theriogenol* 1997; 35:451-457.