

# Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGF2 $\alpha$ en ovejas ciclando

Joel Hernández Cerón\*  
Clara Murcia Mejía\*  
Javier Valencia Méndez\*  
Susana Rojas Maya\*  
Juan Zárate Martínez\*  
Luis Zarco Quintero\*

---

## Abstract

The objective of this study was to evaluate if the administration of steroid-free equine follicular fluid (EFF) suppresses FSH secretion in seasonally anestrous ewes, and if it delays the onset of estrus after treatment with prostaglandin F2 $\alpha$  in cyclic ewes. In the first experiment, 19 seasonally anestrous ewes were divided into two groups. The treated group (n = 10) was treated with 3 ml of EFF every 8 h for 5 days. The control group (n = 9) was treated with physiological saline solution. The EFF was previously treated with charcoal-dextran in order to remove steroid hormones. Blood samples for FSH determination were obtained from both groups every 4 h during the period of the EFF treatment. FSH concentration were compared between groups by a variance analysis for repeated measures that used treatment and time as independent variables. FSH concentrations were significantly lower in the ewes treated with EFF ( $P < 0.05$ ). In the second experiment 22 cyclic ewes were synchronized with a vaginal sponge containing 45 mg of fluorogestone acetate. On day 11, after the synchronized estrous, all animals were treated with 15 mg of PGF2 $\alpha$  in order to induce luteal regression. Synchronized ewes were divided in two groups. Animals in the treated group (n = 11) were injected iv with 3 ml of EFF every 8 h for 72 h, starting on the day of the PGF2 $\alpha$  administration. The ewes in the control group (n = 11) were given physiological saline solution. Estrous detection was carried out every 8 h using males fitted with an apron. The onset of estrous was considered to occur when the female accepted the male for the first time. The interval from PGF2 $\alpha$  to the onset of estrous was significantly longer in the ewes receiving EFF ( $131 \pm 9.9$ ), than in the control group ( $44 \pm 3.9$ ). It is concluded that EFF treatment suppresses FSH concentrations in seasonally anestrous ewes, and delays the onset of synchronized estrous in cyclic ewes. This data indicates that EFF is a rich source of inhibin which is biologically active in the ewe.

**Key words:** EWE, INHIBIN, FSH, PGF2 $\alpha$ , ESTROUS.

## Resumen

Con el propósito de conocer si la administración de líquido folicular equino libre de esteroides (LFE) suprime la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina F2 $\alpha$ , se realizaron dos experimentos. En el primer experimento se utilizaron 19 ovejas en

---

Recibido el 11 de julio de 1996 y aceptado el 17 de enero de 1997.

\* Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

anestro estacional divididas en dos grupos. El grupo tratado ( $n = 10$ ) recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 5 días. El grupo testigo ( $n = 9$ ) recibió solución salina fisiológica (SSF) en lugar de LFE. El LFE fue tratado previamente con carbón-dextrán para remover la fracción de hormonas esteroides. En ambos grupos se obtuvieron muestras de sangre cada 4 h durante el periodo de aplicación del LFE para determinar FSH mediante radioinmunoanálisis en fase líquida. Se compararon las concentraciones de FSH mediante un análisis de varianza, utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra. Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en las ovejas tratadas con LFE. En el segundo experimento se utilizaron 22 ovejas adultas ciclando. A todas las ovejas se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona\* para la sincronización del estro. El día 11 del ciclo subsecuente al estro sincronizado (día 0 = día del estro), todas las ovejas fueron tratadas con 15 mg de PGF2 $\alpha$ \*\* para provocar la regresión del cuerpo lúteo. Las ovejas así tratadas se dividieron en 2 grupos. El grupo tratado ( $n = 11$ ) recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 horas por 72 horas a partir de la aplicación de la PGF2 $\alpha$ . El grupo testigo ( $n = 11$ ) recibió SSF en lugar de LFE. Se detectaron estros 3 veces al día utilizando un macho con mandil, y se consideró el inicio del estro cuando la hembra aceptó la monta por primera vez. El intervalo de la administración de PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente mayor en las ovejas que recibieron LFE ( $131 \pm 9.9$  h) que en las del grupo testigo ( $44 \pm 3.9$  h). Se concluye que el tratamiento con LFE suprime las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro sincronizado con PGF2 $\alpha$  en ovejas cíclicas, lo que indica que el LFE es una fuente rica en inhibina, que tiene actividad biológica en ovejas.

**Palabras clave:** OVEJA, INHIBINA, FSH, PGF2 $\alpha$ , ESTRO.

## Introducción

La inhibina es una hormona glicoproteínica que es producida por las células de la granulosa y está presente en el líquido folicular de la vaca,<sup>12</sup> oveja,<sup>16</sup> cerda<sup>28</sup> y yegua.<sup>25</sup> La administración de inhibina purificada a ovejas ovariectomizadas suprime la secreción de FSH a nivel hipofisiario, sin modificar la secreción de LH.<sup>6,13</sup> La inhibina tiene una elevada homología entre especies,<sup>11</sup> de tal forma que la supresión de la FSH en la oveja también se ha demostrado administrando líquido folicular bovino (LFB) previamente tratado, para remover la fracción de hormonas esteroides.<sup>12,14,17,18</sup> En estos animales se ha observado que después de la administración de LFB se presenta una supresión del desarrollo folicular y de la producción de estradiol, y cuando se administra durante el proestro, se retrasa la presentación del estro.<sup>10,18,19,20</sup>

La utilización de LFB con la finalidad de suprimir el desarrollo folicular y, de esta forma, manipular la vida del cuerpo lúteo, ofrece buenas posibilidades. A este respecto, Beard y Hunter<sup>2</sup> administraron LFB a ovejas con cuerpos lúteos de vida corta y lograron inhibir la luteólisis prematura. Asimismo, Miquelajauregui<sup>22</sup> administró LFB durante los días 10 a 16 del ciclo, logrando retrasar la regresión del cuerpo lúteo y alargar el ciclo estral, con lo que se abrió la posibilidad de desarrollar un método para controlar el periodo de vida del cuerpo lúteo. Sin embargo, no existe mucha disponibilidad de líquido folicular bovino, ya que el foliculo de la vaca es relativamente pequeño (15 a 20 mm

como máximo), además de que la mayoría de las vacas que llegan al rastro no presentan desarrollo folicular.

El líquido folicular equino también representa una fuente rica en inhibina;<sup>25</sup> además, los folículos ováricos de las yeguas son grandes (hasta 50 mm) y casi todas las yeguas presentan desarrollo folicular, aun durante el diestro y la gestación.<sup>8</sup> En la yegua la administración de líquido folicular equino libre de hormonas esteroides (LFE) suprime la secreción de FSH, inhibe el desarrollo folicular y retrasa la presentación del estro.<sup>3,9,21</sup> Sin embargo, no se ha evaluado si el LFE puede provocar estos efectos en la oveja. Por tal razón el objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la administración de LFE sobre la secreción de FSH de ovejas en anestro estacional y determinar el intervalo a la presentación del estro inducido con PGF2 $\alpha$  en ovejas cíclicas tratadas con LFE.

## Material y métodos

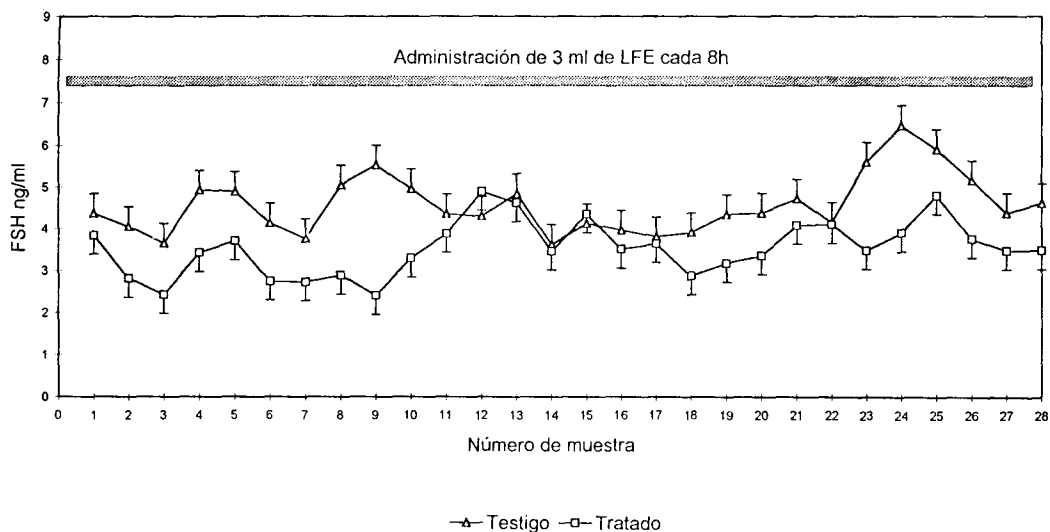
El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (CEPIER) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca. El clima de la región es tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200 mm.<sup>7</sup>

### Preparación del líquido folicular equino

El LFE fue colectado de yeguas sacrificadas en un rastro local. Inmediatamente después del sacrificio se succionó el

\* Chronogest, Intervet, México.

\*\* Lutalyse, UpJohn, México.



**Figura 1.** Concentraciones de FSH de ovejas en anestro tratadas con líquido folicular equino libre de esteroides y testigos ( $P < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas por efecto de la hora en que se tomó la muestra ni la interacción entre esta variable con el tratamiento.

líquido de los folículos visibles y se conservó en refrigeración hasta su traslado al laboratorio. El LFE se centrifugó a 1500  $\times g$  durante 15 minutos a 4 °C para la separación de detritos. Con el fin de remover las hormonas esteroides, se le adicionaron 10 mg/ml de carbón activado y 0.1 mg/ml de dextrán, y permanecieron en agitación magnética durante 1 hora. Posteriormente, el líquido se centrifugó a 1500  $\times g$  durante 30 minutos a 4 °C para separar las partículas de carbón y dextrán. Este procedimiento se repitió 4 veces, y finalmente el sobrenadante se filtró con un filtro de papel del número 1. Al líquido obtenido de esta forma se le adicionaron 100 UI/ml de penicilina G y se conservó en congelación a -20 °C hasta su utilización.<sup>18</sup>

Se realizaron determinaciones de progesterona y estradiol en el líquido folicular antes y después del tratamiento con carbón/dextrán; esta técnica permitió remover el 99% de ambas hormonas esteroides.

### Experimento 1

El trabajo se realizó en abril y mayo, que corresponden a la época de anestro.<sup>24</sup> Se seleccionaron 19 hembras adultas de las razas Hampshire y Suffolk. Con el fin de comprobar su estado de anestro se obtuvieron 3 muestras de sangre con intervalo de 4 días, para determinar el nivel de progesterona por radioinmunoanálisis en fase sólida.<sup>23</sup>

Se formaron al azar 2 grupos: grupo tratado ( $n = 10$ ) y grupo testigo ( $n = 9$ ). El grupo tratado recibió por vía intravenosa 3 ml de LFE cada 8 h durante 5 días. El grupo testigo recibió solución salina fisiológica en lugar de LFE. Se tomaron muestras de sangre cada 4 h durante el periodo de aplicación de LFE. Las muestras se obtuvieron por

venopunción yugular utilizando tubos al vacío heparinizados. Inmediatamente después de la obtención, las muestras se centrifugaron a 1500  $\times g$  durante 10 minutos para la separación del plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Se determinaron las concentraciones de FSH utilizando un radioinmunoanálisis heterólogo en fase líquida.<sup>2</sup> Para el desarrollo del sistema se trató el estándar USDA-bFSH-12 con el método de Iodo-gen. Se utilizó la hormona USDA-oFSH como estándar y el primer anticuerpo (NIDDK-anti-oFSH) se preparó a una dilución de trabajo de 1:8000. La separación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó por centrifugación a 1500  $\times g$  a 4 °C durante 30 minutos con la adición previa de una suspensión celular de *Staphylococcus aureus*\* a una concentración de 45 mg/ml.<sup>26</sup> Bajo estas condiciones, el sistema presentó una sensibilidad de 0.25 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo para la dosis baja (0.397 ng/ml) fueron de 4.41% y 12.02%, respectivamente. Con dosis alta (14.3 ng/ml) los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.73% y 7.13%, respectivamente.

Las concentraciones de FSH se compararon entre grupos mediante análisis de varianza utilizando como variables independientes el tratamiento y la hora en que se tomó la muestra.<sup>27</sup>

### Experimento 2

El experimento se realizó en los meses de septiembre y octubre, que corresponden a los de plena época reproductiva.<sup>24</sup> Se utilizaron 22 ovejas adultas que habían presentado 2 estros previos al inicio del experimento. A todas las ovejas se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona\*\* para la sincronización del estro. Las esponjas se retiraron 14 días después de la inserción; 2 días antes de remover las esponjas se administró a las ovejas 15 mg de PGF2 $\alpha$ \*\*\* por vía

\* Pansorbin cells, Calbiochem, USA.

\*\* Chronogest, Intervet, México.

\*\*\* Lutalyse, UpJohn, México.

intramuscular. La detección de estros se realizó 2 veces al día utilizando un macho con mandil. El inicio del estro se consideró como el día 0 del ciclo. El día 11 del ciclo subsecuente al retiro de la esponja, todas las ovejas se trataron con 15 mg de PGF2 $\alpha$  para provocar la regresión del cuerpo lúteo y permitir el desarrollo folicular preovulatorio. Las ovejas así tratadas se dividieron en 2 grupos: grupo tratado (n = 11) y grupo testigo (n = 11). El grupo tratado recibió 3 ml de LFE por vía intravenosa cada 8 h durante 72 h a partir de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  y el grupo testigo recibió 3 ml de solución salina fisiológica en lugar de LFE. A partir de la aplicación de PGF2 $\alpha$  se detectaron estros 3 veces al día (8,14 y 18 h). Se consideró como inicio del estro cuando la hembra aceptó por primera vez la monta. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre diariamente a partir del momento de la administración de PGF2 $\alpha$  y en los siguientes 2 días, para determinar las concentraciones de progesterona mediante radioinmunoanálisis en fase sólida.

Se comparó el intervalo entre la administración de PGF2 $\alpha$  y la presentación del estro mediante una prueba de t-Student.<sup>27</sup>

## Resultados

### Experimento 1

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores en las ovejas tratadas con LFE que en las que recibieron solución salina fisiológica (Figura 1). Esta diferencia fue más marcada durante las primeras 60 horas posteriores a la administración de LFE.

### Experimento 2

El 100% de las ovejas tuvieron un cuerpo lúteo funcional al momento de la administración de la PGF2 $\alpha$  y sufrieron luteólisis. La concentración promedio de progesterona antes de aplicar la PGF2 $\alpha$  fue de 2.9  $\pm$  0.3 ng/ml, mientras que 24 y 48 horas después, el promedio fue de 0.38  $\pm$  0.05 y 0.12  $\pm$  0.02 ng/ml, respectivamente. El intervalo de la administración de la PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente mayor (P < 0.05) en las ovejas que recibieron LFE (131  $\pm$  9.9 h) que en las ovejas del grupo testigo (44  $\pm$  3.9 h) (media  $\pm$  error estándar).

## Discusión

Las concentraciones de FSH fueron significativamente menores en las ovejas que recibieron LFE durante el anestro que en las testigo. Estos resultados coinciden con los obtenidos con la administración de LFB a ovejas durante el proestro,<sup>18,19</sup> diestro<sup>14,29</sup> y en anestro estacional.<sup>17</sup>

El intervalo de la aplicación de la PGF2 $\alpha$  a la presentación del estro fue significativamente (P < 0.05) más largo en las ovejas tratadas con LFE que en las testigo (131  $\pm$

9.9 h y 44  $\pm$  3.91, respectivamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Miller *et al.*<sup>20</sup> y McNeilly,<sup>18,9</sup> quienes administraron LFB y también observaron un retraso en la presentación del estro en ovejas tratadas con PGF2 $\alpha$ . Miller *et al.*<sup>20</sup> demostraron que la prolongación del proestro en estos animales obedece al efecto del LFB sobre el desarrollo folicular. Ellos realizaron laparoscopias en las ovejas tratadas con LFB y observaron una inhibición del desarrollo folicular asociado con el retraso en la presentación del estro.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando LFE son similares a los conocidos efectos del LFB en ovejas. Además, los resultados observados al tratar ovejas con LFE son similares a los conseguidos en yeguas, en las cuales la administración de LFE retrasa la presentación del estro inducido con PGF2 $\alpha$ <sup>3</sup> y suprime la secreción de FSH en yeguas ovariectomizadas.<sup>9</sup> Estos resultados indican que el LFE es una fuente apropiada de actividad de inhibina para realizar investigación en la oveja, lo que confirma la alta homología que tiene la inhibina en las diferentes especies.<sup>11</sup>

Por otra parte, existe información que indica que el efecto supresor del LFB sobre el crecimiento folicular no sólo es mediado por la FSH, ya que en ovejas tratadas con líquido folicular ovino, al cual previamente se le ha retirado la fracción de inhibina, continúa inhibiendo el desarrollo folicular.<sup>4</sup> De la misma forma, Baxter *et al.*,<sup>1</sup> en condiciones *in vitro*, encontraron que el LFB sin inhibina inhibe la proliferación de las células de la granulosa y la producción de estradiol, y proponen que el efecto del LFB en el retraso del estro obedece a un mecanismo a nivel ovárico. Por otra parte, Law *et al.*<sup>15</sup> señalan que el LFB sin inhibina suprime el desarrollo folicular y retrasa la presentación del estro en vaquillas. Los anteriores resultados indican que en el líquido folicular existen otros factores, además de la inhibina, que participan en la dinámica folicular y particularmente en los mecanismos de dominancia. En el caso del LFE no existe información sobre factores diferentes a la inhibina, presentes en el LFE, que puedan afectar el desarrollo folicular.

Se concluye que el tratamiento con LFE suprime las concentraciones de FSH en ovejas en anestro estacional y retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina F2 $\alpha$ .

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de la Coordinación General de Estudios de Posgrado (PADEP. Proyecto 016301), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT. Proyecto IN202195) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los autores agradecen a los Laboratorios UpJohn e Intervet por la donación de los productos hormonales.

## Literatura citada

1. Baxter, G., O'Shea, T., Campbell, B. and Webb, R.: Effects of bovine follicular fluid (bFF) fractions, which delay oestrus in sheep and cattle, on proliferation and steroid production by cultured granulosa cells. *J. Reprod. Fertil.*, 15 (Abstract Series):64 (1995).
2. Beard, A.P. and Hunter, M.G.: Effects of bovine follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 100:211-217 (1994).
3. Bergfelt, D.R. and Ginther, O.J.: Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine fluid in the mare. *Theriogenology*, 24:99-109 (1985).
4. Campbell, B.K., Picton, H.M., Mann, G.M., McNeilly, A.S. and Baird, D.T.: The effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicle population and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fertil.*, 93:81-96 (1991).
5. Chemineau, P.: Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol 17 $\beta$  and P $_4$  during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*, 17:313-322 (1982).
6. Findlay, J.K., Robertson, D.M. and Clarke, I.J.: Influence of dose and route of administration of bovine follicular fluid and suppressive effect of purified inhibin (M 31 000) on plasma FSH concentrations in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 80:455-461 (1987).
7. García, de M.E.: Modificaciones al Sistema de Clasificación Climatológica de Koeppen. 5a ed. *Instituto de Geografía*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1973.
8. Ginther, O.J.: Folliculogenesis during the transitional period and early ovulation season in mares. *J. Reprod. Fertil.*, 90:311-320 (1990).
9. Gremmes, S.: The secretional profile of gonadotrophins in the mare following hormonal intervention. Doktor Thesis. *Tierärztliche Hochschule Hannover*. Hannover, Germany, 1990.
10. Hunter, M.G., Hindle, J.E., McLeod, B.J. and McNeilly, A.S.: Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. *J. Endocrinol.*, 119:95-100 (1988).
11. Knight, P.G.: Identification and purification of inhibin and inhibin-related proteins. *J. Reprod. Fertil.*, 43:111-123 (1991).
12. Knight, P.G., Castillo, R.J. and Glencross, R.G.: Isolation from bovine follicular fluid (bFF) of a 32 kDalton molecule with potent inhibin-like biological activity (ILA). *J. Endocrinol.*, 112 (Suppl. Abstr.):52 (1987).
13. Knight, P.G. and Castillo, R.J.: Effects of bovine follicular fluid on gonadotrophin secretion in intact and chronically ovariectomized ewes before and after desensitization of pituitary gonadotrophs to gonadotrophin-releasing hormone. *J. Endocrinol.*, 117:431-439 (1988).
14. Larson, G.H., Mallory, D.S., Dailey, R.A. and Lewis, P.E.: Gonadotrophin concentrations, follicular development, and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid. *J. Anim. Sci.*, 69:4104-4111 (1991).
15. Law, A.S., Baxter, G., Logue, D.N., O'Shea, T. and Webb, R.: Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 96:603-616 (1992).
16. Leversha, L.J., Robertson, D.M., Vos de, F.L., Morgan, F.J., Hearn, M.T.W., Wettenhall, R.E.H., Findlay, J.K., Burger, H.G. and Kreiser, D.M.: Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J. Endocrinol.*, 113:213-221 (1987).
17. McLeod, B.J. and McNeilly, A.S.: Suppression of plasma FSH concentrations with bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 81:187-194 (1987).
18. McNeilly, A.S.: Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 72:165-172 (1984).
19. McNeilly, A.S.: Effect of changes in FSH induced by bovine follicular fluid and FSH infusion in the preovulatory phase on subsequent ovulation rate and corpus luteum function in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 74:661-668 (1985).
20. Miller, K.F., Critser, J.K., Rowe, R.F. and Ginther, O.J.: Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol. Reprod.*, 21:537-544 (1979).
21. Miller, K.F., Wesson, J.A. and Ginther, O.J.: Changes in concentrations of circulating gonadotrophins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. *Biol. Reprod.*, 21:867-872 (1979).
22. Miquelajauregui, G.E.M.: Efecto de la inhibina o flunixin-meglumine (finadyne) sobre la luteólisis en ovejas. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1993.
23. Pulido, A., Zarco, L., Galina, C.S., Murcia, C., Flores, G. and Posadas, E.: Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology*, 35:965-975 (1991).
24. Quispe, T., Zarco, L., Valencia, J. and Ortiz, A.: Estrus synchronization with melengestrol acetate in cyclic ewes. Insemination with fresh or frozen semen during the first or second estrus post treatment. *Theriogenology*, 41:1393-1409 (1994).
25. Roser, J.F., McCue, P.M. and Hoye, E.: Inhibin activity in the mare and stallion. *Domes. Anim. Endocrinol.*, 11:87-100 (1994).
26. Ruch Jr., F.E. and Knight, G.T.: Use of soluble and *Staphylococcus aureus*-immobilized second antibody compared in a radioimmunoassay for human  $\alpha$ -fetoprotein. *Clin. Chem.*, 26:1133-1140 (1980).
27. Steel, R.G.D. y Torrie, J.H.: *Biostatística. Principios y Procedimientos*. McGraw-Hill, México, D.F., 1985.
28. Taya, K., Kaneko, H., Watanabe, G. and Sasamoto, S.: Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycles of cows and pigs. *J. Reprod. Fertil.*, 43 (Suppl.):151-162 (1991).
29. Wallace, J.M. and McNeilly, A.S.: Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 73:505-515 (1985).