

Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales

Jesús Ricardo Ake López*
Militza Eugenia Alfaro Gamboa*
Ana María Aguayo Arceo*
Lubos Holy**

Abstract

This study was carried out in three ranches in the state of Yucatan, Mexico. The objective was to study the relationship between plasma progesterone (P_4) concentration at the beginning of the superovulatory treatment, at estrus and at the embryo collection day studying both the ovary response and embryo yield. Eleven days after oestrus, 30 cows were superovulated with the follicle stimulating hormone (FSH-P) and embryos were non-surgically collected 7 days after insemination. Cows with a plasma P_4 concentration above 3 ng/ml at the beginning of the superovulation presented a major number of *corpora lutea* (CL: 12.4 vs. 10.2; $P > 0.05$), total ova and embryos (TOE: 9.3 vs. 4.7; $P < 0.01$) and transferable embryos (TE: 6.6 vs. 3.0; $P < 0.01$) than animals with ≤ 3 ng/ml. All cows showed estrus after the PGF_{2a} injections. Animals with a P_4 concentration ≤ 1 ng/ml at estrus produced more TOE (6.9 vs. 3.0) and TE (4.6 vs. 0.0), than the ones with a P_4 concentration > 1 ng/ml. Animals with > 11 ng/ml of the P_4 concentration at day of embryo collection presented a higher number of CL (15.5 vs. 10.5; $P > 0.05$), TOE (10.0 vs. 5.9; $P < 0.05$) and TE (7.9 vs. 4.6; $P < 0.05$) than cows with a lower plasma P_4 (≤ 11 ng/ml) concentration. It was concluded that cows with a plasma P_4 concentration above 3 ng/ml at the beginning of the superovulation, ≤ 1 ng/ml at estrus and with > 11 ng/ml on the day of embryo collection, had a better response after the superovulatory treatment and produced more embryos. Under tropical conditions, a plasma P_4 concentration prior to the beginning of the superovulatory treatment can be used as a basis to select donor cows with a greater potential response.

KEY WORDS: Progesterone, Superovulated Cows , Embryo Yield, Tropical Conditions.

Resumen

El presente estudio se realizó en condiciones de campo en tres ranchos de la zona centro del estado de Yucatán. El objetivo fue relacionar la respuesta ovárica y la producción embrionaria con la concentración plasmática de progesterona (P_4) al día de inicio de la superovulación, al estro, y al día de la recolección embrionaria. Para ello, 11 días después del estro se superovularon 30 vacas con hormona foliculoestimulante (FSH-P) durante 4 días, a dosis decrecientes. La recolección embrionaria se efectuó 7 días después de la primera inseminación. Las donadoras con concentración plasmática de $P_4 > 3$ ng/ml al iniciar la superovulación, tuvieron mayor promedio de cuerpos lúteos (CL: 12.4 vs. 10.2; $P > 0.05$); total de óvulos y embriones (TOE: 9.3 vs. 4.7; $P < 0.01$) y embriones transferibles (ET: 6.6 vs 3.0; $P < 0.01$) que las vacas con ≤ 3 ng/ml. Las donadoras con concentración plasmática de $P_4 \leq 1$ ng/ml al estro, produjeron más TOE (6.9 vs. 3.0) y ET (4.6 vs. 0.0) que las vacas con > 1 ng/ml de P_4 . Las vacas con > 11 ng/ml de P_4 al día de la recolección

Recibido el 5 de febrero de 1998 y aceptado el 13 de agosto de 1998.

*Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, km 15.5, Carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado Postal 4-116, Mérida, Yucatán, México.

**Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Brno. Palackého 1/3 61242 Brno. Ceská Republika.

embrionaria tuvieron mayor promedio de CL (15.5 vs. 10.5; P>0.05), TOE (10.0 vs. 5.9; P<0.05) y ET (7.9 vs. 4.6; P<0.05) que las donadoras con menor concentración plasmática de P₄ (\leq 11 ng/ml). Se concluye que las donadoras con concentración plasmática de P₄ > 3 ng/ml al iniciar la superovulación, \leq 1 ng/ml al estro y > 11 ng/ml al día de la recolección embrionaria, presentaron mejor respuesta superovulatoria y produjeron más embriones. Bajo condiciones tropicales, la concentración plasmática de progesterona, antes del inicio de la superovulación, puede ser utilizada como un indicador para seleccionar a las donadoras con mayor rendimiento potencial.

PALABRAS CLAVE: Progesterona, Vascas Superovuladas, Producción Embrionaria, Condiciones Tropicales.

Introducción

Uno de los principales factores que limitan el éxito de un programa de ovulación múltiple y transferencia embrionaria (MOET) es la gran variación en la respuesta que sigue al tratamiento superovulatorio.^{1,2} La especie, raza, edad, y el tipo y dosis de gonadotropina utilizada, son algunos de los factores que influyen sobre la respuesta superovulatoria.^{3,4,5,6,7} A pesar de los diversos estudios realizados, la respuesta a la superovulación sigue siendo un factor crítico dentro de la industria de la MOET.⁸ Algunos estudios^{9,10,11} indican que la concentración plasmática de progesterona (P₄) puede ser utilizada como un indicador para seleccionar a las mejores vacas donadoras; sin embargo, los resultados son contradictorios, ya que algunos trabajos encuentran relación entre la producción embrionaria y la concentración de P₄,^{11,12,13} pero otros no.^{14,15,16}

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación de la respuesta ovárica y producción embrionaria con la concentración plasmática de progesterona al inicio de la superovulación, al estro y a la recolección embrionaria en vacas bajo condiciones tropicales.

Material y métodos

El trabajo se realizó bajo condiciones de campo en tres ranchos de la zona centro del estado de Yucatán (20° 58'N y 89° 37'W), México. La región cuenta con clima cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw0) y temperatura promedio anual de 25.9°C.¹⁷ Los animales pastorearon en praderas de zacate Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) con riego; además, recibieron entre 3 y 4 kilos de un suplemento comercial con 14% de proteína cruda. A la evaluación visual, los animales contaban con una condición corporal buena, puntaje 3 en una escala de 1 a 5.¹⁸

Se utilizaron como donadoras, 30 vacas (Holstein, Gelbvieh, Suizo Pardo y Brahman) que tenían una edad entre 4 y 7 años.

Los criterios para seleccionar a las donadoras fueron:

a) Tener el aparato genital en condiciones óptimas, y b) presentar un cuerpo lúteo a la palpación, como indicio de que el animal estaba ciclando. A las vacas Brahman que se encontraban amamantando, se les destetó con un mes de anterioridad a la superovulación. Antes de iniciar el trabajo, se sincronizó el estro de los animales con la finalidad de uniformar el ciclo estral. La superovulación de las donadoras se inició entre los días 10 y 11 del ciclo estral (estro = día 0), se utilizó una dosis total que varió entre 38 y 45 mg/vaca de hormona foliculoestimulante (FSH-P*), la FSH-P se inyectó cada 12 horas durante 4 días a dosis decrecientes.

El estro de las donadoras se indujo y sincronizó mediante la inyección IM de 17.5 mg/animal de Luprostio** al tercer día de iniciada la superovulación; el celo se observó 4 veces al día (06:00, 11:00, 16:00 y 21:00 horas), la inseminación de las donadoras se efectuó al momento de detectar el estro, 12 y 24 horas más tarde, aplicando doble dosis de semen en cada ocasión. La recolección de los embriones se realizó por el método gravitacional no quirúrgico descrito por Elsden *et al.*,¹⁹ siete días después del inicio del estro. El medio de lavado utilizado fue una solución amortiguada con fosfatos,*** enriquecida con 1% de suero fetal bovino.⁴

La búsqueda, evaluación y selección de embriones se realizó en cajas Petri, bajo un estereomicroscopio de 40 y 80 aumentos. La evaluación embrionaria se efectuó con base en lo descrito por Lindner y Wright.²⁰

Se obtuvieron muestras de sangre para medir la concentración de progesterona al momento de iniciar la superovulación, al estro y el día de la recolección embrionaria (día 7 posestro). La sangre se recolectó en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA al 10%), se refrigeró y posteriormente se centrifugó a 1590g durante 10 minutos para obtener el plasma. Una vez recuperado éste, se congeló y conservó a -20 °C hasta su análisis. La concentración de progesterona se cuantificó mediante radioinmunoensayo de fase sólida que utiliza como marcador el I.^{125*} El método fue altamente específico para la progesterona, con menos de 5% de reacción cruzada con la 20a dihidroprogesterona, el límite de detección fue de 0.05 ng/ml, los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 7.5% y 10%, respectivamente.

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de "t" de Student²¹ para analizar las diferencias en la

*FSH-P; Laboratorios Shering Plough, EUA.

** Prosolin; Laboratorios Intervet, México.

***Dulbecco's- PBS; Laboratorios Gibco, EUA.

****Petsera I; PETS, Texas, EUA.

respuesta superovulatoria (cuerpos lúteos, folículos, total de óvulos y embriones, embriones transferibles y embriones no transferibles) de acuerdo a la concentración de progesterona en cada momento evaluado. Para este análisis, se formaron 2 grupos con diferente concentración plasmática de progesterona (P_4), similar a lo realizado en otros estudios.^{11,13} Para el inicio de la superovulación, animales con ≤ 3 ng/ml y animales con > 3 ng/ml de P_4 ; para el estro, animales con ≤ 1 ng/ml y animales con > 1 ng/ml de P_4 ; y para el día de la recolección embrionaria, animales con ≤ 11 ng/ml y animales con > 11 ng/ml de P_4 .

Resultados

En el Cuadro 1, se presenta la respuesta a la superovulación (respuesta ovárica y producción de óvulos y embriones) en los dos grupos de vacas con diferente concentración de progesterona al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio. Se observó que las donadoras con > 3 ng/ml de progesterona tienen mayor promedio en el total de óvulos y embriones (9.3 vs 4.7; $P<0.01$) y en los embriones transferibles (6.6 vs 3.0; $P<0.01$) que los animales con menor concentración de progesterona (≤ 3 ng/ml).

Todas las vacas donadoras ($N=30$) presentaron conducta estral a la inducción y sincronización del estro; sin embargo, a causa de problemas en el manejo de los animales en estro (en dos de los ranchos), sólo se tomaron muestras de sangre a 17 animales

Cuadro 1			
Respuesta ovárica y producción de embriones (promedio \pm desviación estándar) en dos grupos de donadoras con diferente concentración plasmática de progesterona, al inicio del tratamiento superovulatorio			
	$P_4 \leq 3$ ng/lm (n = 9)	$P_4 > 3$ ng/lm (n = 21)	
Cuerpos lúteos	10.2 ± 5.7^a	12.4 ± 8.0^a	
Folículos	1.3 ± 0.9^a	1.8 ± 1.6^a	
Total de óvulos y embriones	4.7 ± 3.0^a	9.3 ± 7.3^b	
Embriones transferibles	3.0 ± 3.5^a	6.6 ± 4.6^b	
Embriones no transferibles	1.0 ± 1.1^a	1.8 ± 3.3^a	

^{a,b} Diferente literal en la misma línea indica diferencia estadística ($P<0.01$).

Cuadro 2

Respuesta ovárica y producción de embriones (promedio \pm desviación estándar) en dos grupos de donadoras con diferente concentración plasmática de progesterona, el día del estro

	$P_4 \leq 1$ ng/lm (n = 6)	$P_4 > 1$ ng/lm (n = 1)
Cuerpos lúteos	9.7 ± 5.8	25.0 ± 0.0
Folículos	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0
Total de óvulos y embriones	6.9 ± 6.6	3.0 ± 0.0
Embriones transferibles	4.6 ± 5.2	0.0 ± 0.0
Embriones no transferibles	1.3 ± 2.9	3.0 ± 0.0

Cuadro 3

Respuesta ovárica y producción de embriones (promedio \pm desviación estándar) en dos grupos de donadoras con diferente concentración plasmática de progesterona, a la recolección embrionaria (día 7 posestro)

	$P_4 \leq 11$ ng/lm (n = 20)	$P_4 > 11$ ng/lm (n = 10)
Cuerpos lúteos	10.5 ± 6.4^a	15.1 ± 7.2^a
Folículos	0.7 ± 1.0^a	2.8 ± 4.2^a
Total de óvulos y embriones	5.9 ± 5.0^a	10.0 ± 7.9^b
Embriones transferibles	4.6 ± 5.0^a	7.9 ± 3.8^b
Embriones no transferibles	1.2 ± 1.2^a	2.4 ± 1.1^a

^{a,b} Diferente literal en la misma línea indica diferencia estadística ($P<0.05$).

en ese momento del estudio. Las vacas con concentración plasmática de progesterona ≤ 1 ng/ml ($n=16$), presentaron mayor promedio en el total de óvulos y embriones (6.9 vs 3.0) y embriones transferibles (4.6 vs 0.0) que la única vaca que presentó mayor concentración de progesterona (> 1 ng/ml; $n=1$) (Cuadro 2). No se realizó el análisis estadístico de los datos al momento del estro, debido a que sólo una vaca donadora tuvo niveles > 1 ng/ml de progesterona, en ese momento.

*Coat -a- Count Procedure. Diagnostic Products Corporation, California, E.U.A.

El día de la recolección embrionaria se observó que las vacas con mayor concentración de progesterona (> 11 ng/ml) presentaron mayor promedio en el total de óvulos y embriones (10.0 vs 5.9; $P<0.05$) y embriones transferibles (7.9 vs 4.6; $P<0.05$) (Cuadro 3), así como un mayor promedio de cuerpos lúteos ($P>0.05$) y embriones no transferibles ($P>0.05$), que las vacas con menor concentración de progesterona ($? 11$ ng/ml).

Discusión

La mayor respuesta superovulatoria en este estudio de las vacas con concentraciones más altas de progesterona plasmática (> 3 ng/ml) al inicio de la superovulación, es similar a lo que se ha registrado en otros estudios.^{11,13} Goto *et al.*¹¹ indican que las vacas con > 3 ng/ml de progesterona al iniciar el tratamiento superovulatorio, tienen más cuerpos lúteos (18.7 vs 10.3) total de óvulos y embriones (16.4 vs 8.1) y embriones transferibles (8.3 vs 2.4) que las donadoras con ≤ 3 ng/ml de progesterona. Herrler *et al.*²² mencionan que las vacas que tienen una concentración plasmática de progesterona inferior a 3 ng/ml al iniciar el tratamiento superovulatorio, presentan una menor respuesta al estímulo superovulatorio. Contrariamente a este hallazgo, Walton y Stubbings²³ trabajando con vacas Holstein, no encontraron relación entre la concentración plasmática de progesterona al inicio de la superovulación, con la tasa de ovulación y el número de embriones viables.

La explicación que se da a la relación que tiene la concentración plasmática de progesterona al inicio de la superovulación con la respuesta a ésta, se basa, en parte, en la funcionalidad o presencia del cuerpo lúteo en ese momento;^{12,24,25,26} ya que existe la posibilidad de que no se alcance a formar un cuerpo lúteo funcional,²⁵ o bien que esta estructura pueda tener una regresión prematura, lo que le permite a estos animales producir embriones, pero en un bajo número y con una calidad inferior.^{12,24,26}

En cuanto a los resultados obtenidos en este estudio al momento del estro, éstos son similares a los registrados por Goto *et al.*,¹¹ los cuales indican que en vacas con concentración de progesterona ≤ 1 ng/ml al estro, se obtuvo un mayor promedio de cuerpos lúteos (20.7 vs 11.5) total de óvulos y embriones (18.7 vs 7.7) y embriones transferibles (7.3 vs 5.7) que en las donadoras con > 1 ng/ml de progesterona. Jensen *et al.*¹² observaron en su estudio que las vacas que presentaron embriones de buena calidad, tuvieron concentraciones de progesterona significativamente más bajas comparadas con aquellas que tuvieron concentraciones más altas y que presentaron mayor cantidad de óvulos sin fertilizar.

Diversos estudios muestran que altas concentraciones de progesterona durante el estro afectan negativamente la producción y calidad de los embriones,^{12,15,24} esto es debido, en gran medida, a un desbalance hormonal, principalmente entre la progesterona y el estradiol, lo que puede afectar negativamente la ovulación, el transporte de los gametos, la fertilización y el adecuado desarrollo embrionario.^{15,24,27,28} El atraso en el descenso o la

persistencia de una concentración alta de progesterona después de la aplicación de la prostaglandina, puede deberse a una incompleta luteólisis,²⁶ o a la formación de estructuras atípicas en el ovario.²⁹ De cualquier forma, cualquiera que sea la causa de la elevación en la concentración de progesterona al momento del estro, ésta influye de manera negativa, tal y como se observó en este estudio.

Por otra parte, en cuanto a la concentración plasmática de progesterona al momento de la recolección embrionaria, en este estudio se encontró, al igual que en otros trabajos,^{11,30,31} que los animales con mayor concentración de progesterona, tuvieron la mejor respuesta superovulatoria. Goto *et al.*¹¹ mencionan que esta relación se debe presumiblemente, a los numerosos cuerpos lúteos presentes, como resultado de la superovulación. Es de esperarse que a mayor número de ovulaciones (y, por lo tanto, mayor número de embriones) haya un mayor número de cuerpos lúteos y éstos dan como consecuencia una concentración más elevada de progesterona.

Probablemente, la evaluación de la concentración plasmática de progesterona al momento de la recolección embrionaria, así como al momento del estro no es muy útil porque no tiene un valor predictivo, ya que el proceso superovulatorio se ha realizado; sin embargo, la concentración plasmática de progesterona en esos momentos, posiblemente pueda relacionarse con la viabilidad de los embriones obtenidos. Diversos estudios indican que la concentración de progesterona en los primeros días después del servicio, tiene relación con la fertilidad de las vacas⁹ y con la calidad de los embriones;¹² pero estos aspectos no fueron evaluados en este estudio.

En conclusión, estos resultados muestran que las vacas que presentan una concentración plasmática de progesterona > 3 ng/ml al inicio del tratamiento superovulatorio, ≤ 1 ng/ml al estro y > 11 ng/ml al día de la recolección embrionaria, tienen la mejor respuesta al estímulo superovulatorio. La evaluación de la concentración plasmática de progesterona el día de inicio del tratamiento superovulatorio puede ser utilizado como una herramienta de gran utilidad para seleccionar a las mejores donadoras, o bien su aplicación puede ayudar a identificar y excluir a animales que se pueden considerar como donadoras de mala calidad;^{26,32} por supuesto, es importante considerar el costo-beneficio y la variabilidad de los resultados.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por la International Foundation for Science (IFS) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Referencias

1. Moniaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 1983;19:55-79.
2. Betteridge KJ, Smith C. Extending the use of embryo transfer in farm animals. Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1988 junio 26-30; Dublin, Ireland. Dublin, Ireland: University College Dublin, 1988;5:255-264.
3. Armstrong DT, Evans G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 1983;19:31-42.
4. Bruce D, Murphy R, Mapletoft J, Manns J, Humphrey W. Variability in gonadotropin preparation as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984;21:117-125.
5. Lerner SP, Thayne VW, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, et al. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci* 1986;63:176-183.
6. Bastidas P, Randel RD. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology* 1987;28:531-540.
7. Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA, Lerner SP. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of cows. *Theriogenology* 1991;36:241-255.
8. Zeitoun MM, Yassen AM, Hassan AA, Fathelbab AZ, Echternkamp SE, Wise TH, Maurer RR. Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* 1991;35:653-667.
9. Erb RE, Gaverick HA, Randel RD, Brown BL, Callahan CJ. Profiles of reproductive hormone associated with fertile and nonfertile insemination of dairy cows. *Theriogenology* 1976;5:227-241.
10. Tamboura D, Chupin D, Saumande J. Superovulation in cows: a relationship between progesterone secretion before ovulation and the quality of embryos. *Anim Reprod Sci* 1985;8:327-334.
11. Goto K, Nakanishi Y, Ohkutsu S, Ogawa K, Tasaki M, Ohta M, et al. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology* 1987;27:819-826.
12. Jensen AM, Greve T, Madej A, Edquist LE. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 α treated cow. *Theriogenology* 1982;18:33-44.
13. Goto K, Ohkutsu S, Nakanishi Y, Ogawa K, Tasaki M, Ohta M, et al. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology* 1988;29:615-629.
14. Sreenan JM, Gosling JP. The effect of cycle stage and plasma progesterone levels on induction of multiple ovulations in heifers. *J Reprod Fert* 1977;50:367-369.
15. Saumande J. Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J Endocrinol* 1980;84:425-437.
16. Yadav MC, Walton JS, Leslie KE. Plasma concentrations of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology* 1986;26:523-540.
17. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Anuario estadístico del estado de Yucatán. México (DF): INEGI, 1993.
18. Houghton PL, Lemenager RP, Horstman LA, Hendrix KS, Moss GE. Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *J Anim Sci* 1990;68:1438-1446.
19. Elsden RP, Hasler JF, Seidel GE. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 1976;6:523-532.
20. Lindner GM, Wright RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983;20:407-417.
21. Steel RGD, Torrie JDB. Bioestadística. Principios y procedimientos. México, (DF): McGraw-Hill, 1985.
22. Herrler A, Elsaesser F, Nieman H. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 1990;33:415-422.
23. Walton JS, Stubbings RB. Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 1986;26:167-177.
24. Greve T, Callensen H, Hyttel P. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 1984;21:238 (Abstr.).
25. Smith MF. Recent advances in corpus luteum physiology. *J Dairy Sci* 1986;69:911-926.
26. Callensen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology* 1988;30:477-488.
27. Maurer RR, Echternkamp SE. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology* 1982;17:11-22.
28. Russell OC, Leslie EM, Thompson FN. Effects of progesterone or estradiol on uterine tubal transport of ova in the cow. *Theriogenology* 1987;13:141-154.
29. Bono G, Gabai G, Silvestrelli L, Comin A. Superovulatory and endocrinological responses of Simmental cows treated either with PMSG or hMG or in combination. *Theriogenology* 1991;35:1179-1190.
30. Saumande J, Tamboura D, Chupin D. Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology* 1985;23:729-731.
31. Kweon OK, Kanagawa H, Takahashi Y, Miyamoto A, Masaki J, Umezawa M, et al. Plasma endocrine profiles and total cholesterol levels in superovulated cows. *Theriogenology* 1987;27:841-857.
32. Callensen H, Back A, Greve T, Avery B, Gotfredsen P, Holm P, et al. Hormonal parameters for evaluation of superovulated heifers. *Theriogenology* 1989;31:180 (Abstr.).