

ผลการกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยการใช้ออร์โมนเอฟเอสเฮชเข้ากล้ามเนื้อชนิดแบ่งฉีดสองเข็มในโคนมลูกผสมพันธุ์ไทยโฮลสไตน์

Superovulation response to a split-single intramuscular administration of FSH in Thai-Holstein crossbred

ธนพร ราษฎร์ศิริ¹, เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1,2}, ฤทัยพร ราชมัคร¹, รุจิรา ชุ่มชัย¹,
วุฒิกร บุญคุ้ม^{1,2} และ วิบันทิตา จันทร์กิตติสกุล^{1,2*}

Thanaporn Ratsiri¹, Thevin Vongpralub^{1,2}, Ruthaiporn Ratchamak¹,

Rujira Chumchai¹, Wuttigrai Boonkum^{1,2} and Vibuntita Chankitisakul^{1,2*}

บทคัดย่อ: การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ โดยการใช้ฮอร์โมน FSH ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก. (สำหรับการออกฤทธิ์อย่างช้า) ในโคนมลูกผสมพันธุ์ไทยโฮลสไตน์ โดยแบ่งโคทดลองจำนวน 6 ตัวออกเป็น 2 กลุ่ม ตามแผนการทดลอง simple cross-over (โดยมีระยะพักสัตว์ในแต่ละช่วงการทดลอง 60 วัน) (1) กลุ่มควบคุม (n=6) ได้รับการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ทุกๆ 12 ชั่วโมงทางกล้ามเนื้อ เป็นเวลา 4 วัน (2) กลุ่มที่รีพเมนต์ (split-single injection) (n=6) ได้รับการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก.(0.5% hyaluronan) ทางกล้ามเนื้อ โดยแบ่งฉีดเป็น 2 ครั้งห่างกัน 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า โคทุกตัวแสดงอาการเป็นสัด โดยโคกลุ่มทดลองและกลุ่มที่รีพเมนต์มี จำนวนเฉลี่ยของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (13.3 ± 1.8 และ 12.0 ± 2.0 ใบ ตามลำดับ) จำนวนเฉลี่ยของคอร์ปัสลูเทียม (10.7 ± 1.09 และ 10.0 ± 1.79 ใบ ตามลำดับ) จำนวนเฉลี่ยของฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่ (2.0 ± 0.51 และ 1.7 ± 0.61 ใบ ตามลำดับ) อัตราการตกไข่ (83.2 ± 4.95 และ 82.8 ± 8.29 % ตามลำดับ) และการตอบสนองของรังไข่ (12.67 ± 0.62 และ 11.67 ± 1.63 ใบ ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก. แบ่งฉีด 2 เข็มห่างกัน 48 ชั่วโมงทางกล้ามเนื้อ สามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล และการตกไข่หลายใบในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ได้เทียบเท่ากับโปรโตคอลพื้นฐานที่ฉีดฮอร์โมนวันละ 2 ครั้ง

คำสำคัญ: การกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ, FSH, การออกฤทธิ์อย่างช้า, โคนมลูกผสมพันธุ์ไทยโฮลสไตน์

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

² กลุ่มวิจัยโคนมหนองนา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of a split-single intramuscular protocol of FSH on ovarian responses in Thai-Holstein crossbred. Cows (n=6) were assigned to one of two treatment groups to be superstimulated two times in simple cross-over design (with a transitional period of 60 days): (1) control group, cows (n=6) received 400 mg of FSH twice daily IM over 4 days. (2) split-single administration group, cows (n=6) received 400 mg of FSH dissolved in MAP-5 50 mg (0.5% hyaluronan) (for slow released effect), divided into 2 IM injections with a 48h interval. The results of the experiment showed that all cows exhibited estrus behaviors. The numbers of large follicle (13.3 ± 1.8 and 12.0 ± 2.0 , respectively), numbers of CLs (10.7 ± 1.09 and 10.0 ± 1.79 , respectively), unovulated follicles (2.0 ± 0.51 and 1.7 ± 0.61 , respectively), ovulation rates (83.2 ± 4.95 and 82.8 ± 8.29 %, respectively) and ovarian responses (12.67 ± 0.62 and 11.67 ± 1.63 , respectively) were not different between groups ($P > 0.05$). In conclusion, superovulation of Thai-Holstein crossbred cows with a split-single intramuscular injection of FSH diluted in MAP-5 50 mg resulted in a comparable superovulation response to the traditional twice-daily intramuscular injection protocol.

Keywords: Superovulation, FSH, slow release, Thai-Holstein crossbred

บทนำ

จุดประสงค์หลักของการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ (superovulation) ในโค คือ การเพิ่มจำนวนการตกไข่ต่อหนึ่งวงจรการเป็นสัด ทำให้ได้จำนวนตัวอ่อนที่สามารถย้ายฝากและอัตราการตั้งท้องเพิ่มขึ้นหลังการย้ายฝากตัวอ่อน (Bo et al., 2002) อย่างไรก็ตาม โปรโตคอล (protocol) การกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน ซึ่งฮอร์โมนที่นิยมใช้ในการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบในปัจจุบันคือ Follicle stimulating hormone (FSH) ที่มีค่าครึ่งชีวิตในโคประมาณ 5 ชั่วโมง (Demoustier et al., 1988) ทำให้ต้องมีการฉีดทุก 12 ชั่วโมงทางกล้ามเนื้อต่อเนื่องเป็นเวลา 4-5 วัน ส่งผลให้ต้องมีการจับบังคับสัตว์บ่อย ก่อให้เกิดความเครียดในสัตว์ และเกิดข้อผิดพลาดในการฉีดฮอร์โมนได้ง่าย โดยความเครียดที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อการตอบสนองการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ คุณภาพและจำนวนของตัวอ่อนที่ลดลง (Bo et al., 1994) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโปรโตคอลทางเลือกในการฉีดฮอร์โมน FSH เพียง 1-2 ครั้งเพื่อง่ายต่อการใช้งาน ลดค่าใช้จ่าย ลดแรงงาน ลดความเครียดที่เกิดจากการจับบังคับสัตว์ และเพิ่มการตอบสนองในการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ

โปรโตคอลทางเลือกในการฉีดฮอร์โมน FSH ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า โคเนื้อที่มีคะแนน

ร่างกายที่ดี การฉีดฮอร์โมน FSH ให้เพียง 1 ครั้งทางชั้นใต้ผิวหนังจะให้ผลการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบได้เทียบเท่ากับการฉีดฮอร์โมนด้วยโปรโตคอลพื้นฐาน (Bo et al., 1994) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า วิธีการนี้ให้ผลการตอบสนองที่ไม่ดีในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ เนื่องจากมีการสะสมเนื้อเยื่อไขมันที่ชั้นใต้ผิวหนังน้อย (Hockley et al., 1992) นอกจากนี้ โปรโตคอลทางเลือกที่ได้รับความนิยม คือ การละลาย FSH ในสารละลายที่มีฤทธิ์ปลดปล่อยช้าๆ หรือพอลิเมอร์ (polymer) เพื่อให้ฮอร์โมนถูกปล่อยออกเป็นเวลาหลายวันเพื่อไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล เช่น polyvinyl pyrrolidone (Bo et al., 1994), aluminium gel (Kimura et al., 2007) และ hyaluronan-base (Tribulo et al., 2011) เป็นต้น

Hyaluronan เป็นโพลิเมอร์ที่เหมาะสมกับการนำมาใช้ร่วมกับการให้ FSH โดยที่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเมื่อฉีดให้กับสัตว์ (Fouladi-Nashta et al., 2017) โดยการใช้ 2% hyaluronan มักพบปัญหาความหนืดและผสมเข้ากับฮอร์โมน FSH ลำบาก จึงมีการลดความเข้มข้นของสารละลาย hyaluronan เป็น 0.5% และ 1% แต่การลดความเข้มข้นของ hyaluronan ลง และฉีดทางชั้นกล้ามเนื้อส่งผลทำให้การตอบสนองการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบลดลง จึงมีการปรับการฉีดฮอร์โมน FSH ที่ละลายใน 0.5% และ 1% hyaluronan เป็น 2 ครั้งห่างกัน 48 ชม. ทางกล้ามเนื้อ ซึ่งในโคเนื้อให้ผลการตอบสนองการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบ

ได้ไม่แตกต่างจากการฉีดฮอร์โมน FSH วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลาหลายวัน (Tribulo et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการฉีดฮอร์โมน FSH ที่ละลายใน hyaluronan ในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ยังมีน้อย และให้ผลการตอบสนองการกระตุ้นการตกไข่หลายใบไม่เป็นที่น่าพอใจนัก และยังไม่มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และเก็บตัวอ่อน จากการใช้ฮอร์โมน FSH ที่ละลายใน hyaluronan ในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของฟอลลิเคิล และการตกไข่พร้อมกันหลายใบ โดยการให้ฮอร์โมน FSH ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก. (0.5 % hyaluronan) เพื่อลดจำนวนครั้งในการฉีดฮอร์โมน ง่ายต่อการใช้งาน และลดความเครียดที่เกิดจากการจับบังคับสัตว์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

โคนมเพศเมียพันธุ์ไทย-โฮลสไตน์ (Thai-Holstein) อายุประมาณ 3-6 ปี มีวงรอบในการเป็นสัดปกติ และแสดงอาการเป็นสัดเองภายใน 60 วัน

หลังคลอด น้ำหนัก 450-600 กิโลกรัม มีคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายประมาณ 3-3.5 (โดยแบ่งระดับคะแนนเท่ากับ 1-5) จำนวน 6 ตัว จากสถานีวิจัยทดลองและฝึกอบรมเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวางแผนการทดลองและการกระตุ้นการตกไข่หลายใบพร้อมกัน

โคนมทั้งหมดถูกสุ่มเพื่อได้รับทรีทเมนต์หนึ่งในสองกลุ่มทรีทเมนต์ โดยโคทั้ง 2 กลุ่ม มีการทำซ้ำแต่ละโปรโตคอลที่แตกต่างกันใน 2 ช่วงเวลาตามแบบแผนการทดลอง simple cross-over (โดยมีระยะพักสัตว์ในแต่ละช่วงการทดลอง 60 วัน) ซึ่งโคในกลุ่มควบคุมได้รับฮอร์โมน FSH (Folltropin®-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) รวมทั้งหมด ขนาด 400 มก. โดยแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้งแบบลดโดสทางกล้ามเนื้อ ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน และโคในกลุ่ม split-single injection ได้รับ FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน 5% hyaluronan 10 มล. (MAP-5 50 mg®, Bioniche Animal Health, Inc.) แล้วแบ่ง 300 มก. ฉีดทางกล้ามเนื้อในวันที่ 4 (D4) และฉีด 100 มก. ทางกล้ามเนื้อใน 48 ชม.ต่อมา (D6) (Figure 1)

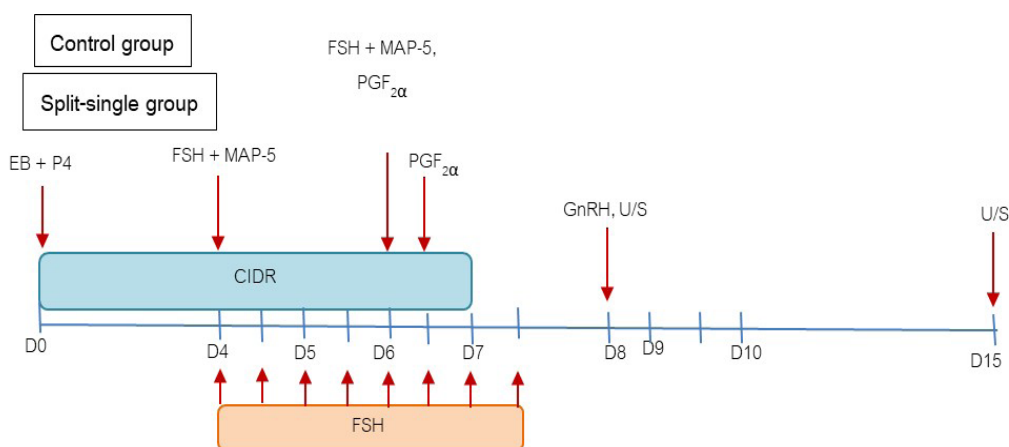


Figure 1 Schematic representation of two superovulation protocols. Control group received a total FSH dose of 400 mg in eight decreasing doses administered IM at 12-hour intervals over a 4-day period. Split-single group received the same amount of FSH, which was suspended in MAP-5 50 mg and administered IM twice 48 hours apart (300 and 100 mg).

การประเมินการตอบสนองของรังไข่

โคนมทุกตัวในทุกกลุ่มการทดลองถูกอัลตราซาวด์ (ultrasound, U/S) รังไข่ในวันที่ 8 ช่วงเวลาเดียวกับที่มีการฉีด GnRH เพื่อประเมินการตอบสนองของรังไข่หลังจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH โดยทำการนับจำนวนฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ (≥ 9 มม.) และทำการยืนยันการตอบสนองการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบโดยการนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม (CL) และฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่ (unovulated follicle) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 5 มม. ในวันที่ 15 (D15) โดยโคที่พบจำนวน CL มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ใบถือว่าตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ แต่หากไม่พบ CL หรือพบน้อยกว่า 3 ใบ ถือว่าโคไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น การตอบสนองของรังไข่ (ovarian response) คำนวณจากการรวมจำนวน CL และฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่ในวันที่ 15 และอัตราการตกไข่ (ovulation rate) จะคำนวณโดยใช้จำนวน CL และการตอบสนองของรังไข่

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลผลการทดลองทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ simple cross-over โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SAS 9.0 statistical software package

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้โปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก.แบบ split-single ทางกล้ามเนื้อในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ ผลแสดงดังใน Table 1 โดยพบว่า โคทุกตัวแสดงอาการเป็นสัด จำนวนเฉลี่ยของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ จำนวนเฉลี่ยของคอร์ปัสลูเทียม จำนวนเฉลี่ยของฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่ อัตราการตกไข่ และการตอบสนองของรังไข่ ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) กับโปรโตคอลพื้นฐานที่มีการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 4 วัน ทางกล้ามเนื้อ แสดงให้เห็นว่าการลดจำนวนครั้งในการฉีดฮอร์โมน FSH ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตอบสนองของ

ฟอลลิเคิลจนเกิดการตกไข่ที่เป็นผลจากฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน สอดคล้องกับรายงานการเปรียบเทียบโปรโตคอลพื้นฐานกับโปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH แบบออกฤทธิ์ยาวนาน (long-acting recombinant FSH) ในการกระตุ้นการตกไข่พร้อมกันหลายใบในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (Carvalho et al., 2014)

ความเข้มข้นของฮอร์โมน FSH ในกระแสเลือดจะขึ้นอยู่กับการดูดซึมจากตำแหน่งที่ให้ฮอร์โมน และการกำจัดออกจากกระแสเลือด (metabolic clearance) (Demoustier et al., 1988) ซึ่งหากมีการดูดซึมฮอร์โมน FSH ที่เร็วจะส่งผลให้มีการกำจัดฮอร์โมนออกจากร่างกายเร็วตามไปด้วย ทำให้การที่ฟอลลิเคิลได้รับการกระตุ้นจาก FSH ระดับสูงในระยะเวลานั้นๆ อาจไม่เพียงพอต่อการเจริญจนทำให้เกิดการตกไข่ได้ ในขณะที่โปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก.แบบ split-single injection ทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลจนเจริญเต็มที่และเกิดการตกไข่ได้เนื่องจาก hyaluronan เป็นโพลิเมอร์ เมื่อทำละลายกับฮอร์โมน FSH จะทำให้มีการปลดปล่อยฮอร์โมนออกมาอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง ทำให้สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน FSH ในกระแสเลือดให้เพียงพอต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง (Vieira et al., 2015) สอดคล้องกับการรายงานของ Tribulo และคณะ (2012) ที่ศึกษาโปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก. แบบ split-single injection ทางกล้ามเนื้อในโคนม ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก.แบบฉีด 2 เข็มห่างกัน 48 ชั่วโมง (split-single injection) ทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ได้เทียบเท่ากับโปรโตคอลพื้นฐานที่ฉีดฮอร์โมนวันละ 2 ครั้ง

สรุป

โปรโตคอลการฉีดฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. ที่ทำละลายใน MAP-5 50 มก. แบ่งฉีด 2 เข็มห่างกัน

48 ชั่วโมง (split-single injection) ทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล และการตกไข่พร้อมกันหลายใบในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ได้เทียบเท่ากับโปรโตคอลพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้วิเคราะห์ในส่วนของจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน ดังนั้น การทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อนจะบ่งบอกประสิทธิภาพของโปรโตคอลในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบพร้อมกันในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ได้ดีมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัท เอส อาร์ ซี แอ็นนิมัล เฮลท์ จำกัด ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท และโครงการการผลิตลูกโคนมเพศเมียที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมของเบต้าเคซีนชนิดเอสอง (A2 β -casein type) ด้วยวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง บริษัทแมรี่แลนด์ แคร์รี่ โปรดักส์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย สถาบันทดลองและฝึกอบรมเกษตรกรและกลุ่มวิจัยโคนมหนองวัวซอ ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลอง และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Bo, G. A., D. Hockley, L. Nasser and R. J. Mapletoft. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. 42:963–975.
- Bo, G. A., P. S. Baruselli, D. Moreno, L. Cutaia, M. Caccia, R. Tribulo, H. Tribulo and R. J. Mapletoft, 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57:53–72.
- Carvalho, P. D., K. S. Hackbart, R. W. Bender, G. M. Baez, A. R. Dresch and J. N. Guenther. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*. 82:481–489.
- Demoustier, M. M., J. F. Beckers, P. Van Der Zwalm, J. Closset, J. L. Gillard and F. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*. 30:379–86.
- Fouladi-Nashta, Ali A., A. K. Raheem, F. W. Marei, and H. G. M. Ghafari. 2017. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction. *Reproduction*. 153:R43-R58.
- Hockley, D. K., G. A. Bo, A. T. Palasz, M. R. Del Campo and R. J. Mapletoft. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology*. 37:224.
- Kimura, K. M., H. Hirako, Iwata, M. Aoki, M. Kawaguchi and M. Seki. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*. 68:633–639.
- Tribulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R. V. Alasino, D. Beltramo, I. Bianco, R. J. Mapletoft and G. A. Bo. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*. 129:7–13.
- Tribulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R. J. Mapletoft and G. A. B. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 77:1679–1685.

Vieira L.M., C. A. Rodrigues, N. A. Castro, B. M. Guerreiro, C. R. A. Silveira and R. J. C. Moreira. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 82:318-324.