

Uso de eCG asociada al control de la dinámica folicular: IATF, TETF y SPO

Pietro S. Baruselli, José Nélio S. Sales, Gabriel A. Crepaldi, Marcio O. Marques, Roberta M. Ferreira, Manoel F. de Sá Filho, Lais M. Vieira

1. Introducción
2. Propiedades farmacológicas de la eCG
3. Uso de la eCG en protocolos de IATF
 - 3.1 Reducción del intervalo entre el parto y la IATF empleando tratamiento con eCG
 - 3.2 Uso de eCG para IATF en vacas Holstein de alta producción
4. Superovulación de donantes de embriones con eCG
 - 4.1 Uso de eCG para superestimulación
5. Programas de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)
 - 5.1 Uso de eCG en la formación de CL y en la producción de P4 en receptoras *Bostaurus x Bosindicus*
6. Conclusiones
7. Bibliografía

más eficiente para el mejoramiento genético, tanto en vacas de leche como de carne. De esa manera, se tornó necesaria la adopción de buenas técnicas de manejo (nutrición, sanidad, etc.), asociadas al uso de la inseminación artificial (IA) con semen de toros probados genéticamente, con el objetivo de mejorar la eficiencia reproductiva, con un consecuente aumento en la producción de terneros de calidad y en la rentabilidad de la propiedad.

Existe en la actualidad una tecnología para sincronizar el crecimiento folicular y la ovulación en bovinos. Para este fin, se emplean una cantidad de tratamientos (protocolos) que tienen como objetivo sincronizar la ovulación para el uso de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), la cual elimina la necesidad de la detección de celo, contribuyendo en gran medida a la utilización práctica de esta biotecnología. Los estudios científicos indican que la IATF puede emplearse incluso en vacas en anestro, anticipando la ovulación posparto y mejorando la eficiencia reproductiva del rodeo ⁽¹¹⁾. Sin embargo, en estas condiciones, la investigación indica la importancia del tratamiento con eCG (gonadotropina coriónica equina) para aumentar la tasa de ovulación y la tasa de preñez después de la sincronización con protocolos de IATF ^(10, 18).

1. Introducción

La sustentabilidad de las actividades agropecuarias ha sido foco de innumerables debates y proyectos en los últimos años. De este modo, el desarrollo y la productividad de las actividades agropecuarias deben maximizar su eficiencia para que no se comprometa el futuro de la sustentabilidad global. Históricamente, la inseminación artificial se reveló como la herramienta

Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil.
barusell@usp.br
Trabajo presentado en la Jornada Syntex de Reproducción en rodeos de cría, Tandil, 20 de septiembre de 2013.

Recibido: 4 de noviembre de 2013
Aceptado: 21 de noviembre de 2013.
Taurus. Año 16, Nº62: 32-42

Además de su empleo en IATF, la eCG tiene un papel importante en la superovulación y transferencia de embriones en programas a tiempo fijo. Pese a la creciente producción brasilera de embriones *in vitro* (318.116 embriones), todavía fueron transferidos 35.563 embriones *in vivo* ⁽³⁰⁾, lo que proyecta aproximadamente 6.000 superovulaciones por año. Estos resultados ponen a Brasil como el primer productor de embriones bovinos, que representa el 30% (353.679 embriones) de la producción mundial.

Fueron realizadas investigaciones para viabilizar el uso de eCG en programas de superovulación tanto en *Bos indicus* como en *Bos taurus*, con el objetivo de facilitar el manejo (dosis única), sin comprometer la producción de embriones. Innumerables factores interfieren en la eficiencia de los programas de TE, en especial respecto a las receptoras ^(29, 59). Esto se debe, en general, a que los programas comerciales de TE presentan bajas tasas de aprovechamiento (% de receptoras aptas para recibir un embrión/total de receptoras tratadas). Normalmente, en un lote de receptoras tratadas con protocolos tradicionales (uso de prostaglandina asociada a detección de celos), solamente el 40 a 50% de los animales son aprovechados para ser transferidos. Considerándose una tasa de concepción del 50% sobre el total de los animales aprovechados, se obtiene apenas un 20 a 25% de preñeces al final del tratamiento ^(4, 19). De esta manera, el incremento de las tasas de aprovechamiento y de concepción de receptoras es fundamental para maximizar la tasa de preñez y con esto, elevar el retorno productivo y económico de la TE. Fueron reportados efectos positivos del uso de eCG en receptoras de embriones tratadas con protocolos de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF), debido a que aumentó la tasa de aprovechamiento e indujo la formación de un cuerpo lúteo (CL) que produjo más progesterona (P4) el día de la transferencia ^(6, 19).

Considerando los conocimientos existentes sobre IA, SPO y TE a tiempo fijo el objetivo de esta revisión es discutir sobre los avances en los protocolos de sincronización, enfatizando sobre la posibilidad del uso de eCG.

2. Propiedades farmacológicas de la eCG

La eCG es un fármaco de vida media larga (hasta 3 días), producido por las copas endometriales de la yegua preñada (40 a 130 días ⁽⁴²⁾), que se une a los receptores de FSH y LH de los folícu-

los y los receptores de LH del cuerpo lúteo ⁽⁶⁰⁾. En equinos, la eCG causa ovulación o luteinización de los folículos durante la gestación, con el consecuente aumento de la P4 circulante ⁽⁴²⁾.

La eCG está compuesta por dos sub-unidades (α -compuesta por 96 aminoácidos; y β -compuesta por 149 aminoácidos). Una característica importante de la molécula de eCG es la existencia de grandes cantidades de carbohidratos (aproximadamente 45% de su masa) principalmente N-acetil neuramina (o ácido siálico), primordialmente presente en la subunidad β de la molécula de eCG, lo que proporciona una gran vida media a este compuesto químico ⁽⁴²⁾. Debido al alto peso molecular y la presencia de ácido siálico, la molécula de eCG posee carga negativa, lo que dificulta su filtración glomerular y aumenta aún más su vida media. Debido a todos estos factores, la vida media de la eCG cuando es aplicada en bovino es larga ⁽⁵⁷⁾.

Cuando la eCG es administrada en vacas en anestro crea condiciones para estimular el crecimiento folicular y la ovulación, incluso en vacas que tengan comprometida la liberación de gonadotropina. Su uso ha presentado efecto positivo en rodeos con baja tasa de ciclicidad (anestro), en animales recién paridos (período pos-parto inferior a 2 meses), en animales con condición corporal comprometida [$\leq 2,5$ en la escala de 1 a 5; ⁽³⁾] y en animales que presentan comprometido el crecimiento del folículo dominante ⁽³⁹⁾. Debido a su acción FSH y LH y a la larga vida media, la eCG puede ser utilizada en dosis única en protocolos de superovulación de donantes ⁽¹²⁾ y asociada a los protocolos de sincronización de receptoras de embriones ⁽⁶⁾.

3. Uso de la eCG en protocolos de IATF

Existen en la literatura científica controversias sobre el uso de eCG en protocolos de sincronización para IATF. Algunos trabajos indican efecto positivo y otros demostraron que la eCG no aumenta la tasa de concepción a la IATF. Los resultados de nuestro grupo de investigación también presentan variación en cuanto al efecto de la eCG a la IATF. Después de realizar innumerables trabajos con grandes cantidades de animales verificamos que en algunos experimentos, el tratamiento con eCG (400UI a la retirada del dispositivo) aumentó significativamente la tasa de concepción a la IATF. Sin embargo, en otros experimentos no fue encontrado ningún efecto positivo (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de concepción a la IATF (%) de vacas tratadas o no con eCG al momento de la retirada de los dispositivos de progesterona y/o progestágenos.

Publicación		Con eCG	Sin eCG	Valor de P
Baruselli y col. (2003)	Nelore	55,1 (59/107)	38,9 (42/108)	< 0,05
Baruselli y col. (2003)	Brangus	61,8 (199/332)	59,6 (192/332)	> 0,05 NS
Marques y col. (2004)	Nelore	58,1 (172/296)	61,9 (179/289)	> 0,05 NS
Silva y col. (2004)	Nelore	51,7 (155/300)	33,8 (101/299)	< 0,05
Rodrigues y col. (2004)	Nelore	50,9 (56/110)	37,8 (37/98)	< 0,05
Penteado y col. (2004)	Nelore	55,6 (125/225)	42,2 (98/232)	< 0,05
Sales y col. (2011)	Nelore	71,6 (78/109)	61,5 (59/96)	< 0,05
Sá Filho y col. (2013)	Nelore	43,1 (37/86)	36,9 (32/86)	> 0,05 NS

NS=no significativo

Para intentar comprender el motivo de esta gran variación en los resultados de la literatura iniciamos trabajos intentando estudiar el efecto del tratamiento con eCG conforme al patrón de ciclicidad de los animales al inicio de los protocolos. En un estudio realizado con 215 vacas Nelore paridas (75 ± 19 días pos-parto⁽¹⁰⁾), se comprobó un efecto positivo de la eCG conforme al grado de anestro. En animales en anestro (sin CL; ya sea con folículos grandes como pequeños) hubo efecto positivo del tratamiento con eCG, en tanto que, en los animales cíclicos (con presencia de CL), no se notó aumento en la tasa de concepción a la IATF. El efecto positivo de la eCG fue más evidente conforme aumentó la intensidad del anestro. Los resultados positivos de la utilización de eCG solamente en animales en anestro también fueron constatados en un estudio hecho en Argentina⁽²⁴⁾ y están también presentados y discutidos en revisiones científicas^(13, 18).

Nuestro grupo de investigación también realizó otros experimentos para confirmar el efecto positivo del tratamiento con eCG conforme a la ciclicidad. Rodrigues y col.⁽⁴⁹⁾ verificaron que sólo los animales en anestro (ausencia de CL al inicio del tratamiento) responden positivamente al tratamiento con eCG [52,2% (47/90) vs. 36,5% (27/74); $P < 0,05$]. En los animales que están ciclando (presencia de CL al inicio del tratamiento) no fue verificado aumento en las tasas de concepción luego del tratamiento con eCG.

En otro estudio realizado por nuestro grupo, con el objetivo de evaluar los efectos del uso de

eCG en la dinámica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) comprobadamente en anestro y sincronizadas para ser IATF, se verificó que el tratamiento con eCG al retiro del implante auricular de progestágeno aumentó el diámetro del folículo dominante (Figura 1), además de aumentar la tasa de ovulación (50,0% vs. 73,1%, $P=0,04$) y de concepción (20,8% vs. 46,2%, $P=0,02$). Este efecto también fue confirmado en vaquillonas Nelore ciclando y tratadas con dispositivos intravaginales con P4[CIDR; ⁽¹³⁾]. Animales cíclicos (presencia de CL) presentan un aumento significativo en los niveles circulantes de P4 durante el tratamiento, lo que puede comprometer la pulsatilidad de la LH y el crecimiento del folículo dominante⁽²¹⁾. Las vaquillonas cíclicas tratadas con eCG al retiro del dispositivo con P4 presentaron un aumento significativo en la tasa de ovulación [sin eCG=50,0% (10/20) vs. con eCG=76,2% (16/21); $P < 0,05$; ⁽³⁾]. Verificamos que el tratamiento con eCG también aumentó la tasa de preñez en vaquillonas Nelore ciclando tratadas con dispositivos intravaginales con P4 para IATF [sin eCG=15,7% (31/197) vs con eCG=34,9% (68/195); $P < 0,05$; ⁽³⁸⁾]. A pesar del aumento significativo del tratamiento con eCG en la tasa de preñez, los resultados estuvieron por debajo de lo esperado, indicando que otros efectos están influenciando la eficiencia de la IATF en vaquillonas Nelore

Con el objetivo de comprender mejor el efecto de la eCG en la IATF en vacas de carne, realizamos un estudio retrospectivo⁽¹³⁾ para evaluar el efecto del tratamiento con eCG en función de la

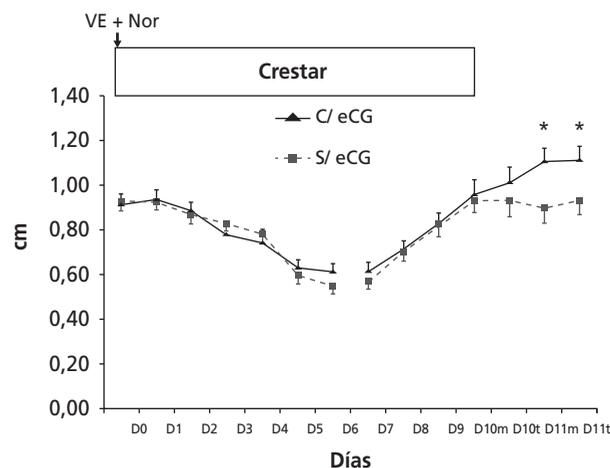


Figura 1. Dinámica folicular de vacas Nelore en anestro tratadas con implante auricular con Norgestomet asociado o no a 400 UI de eCG en el momento de la retirada del implante auricular (Día 9).

condición corporal (escala 1-5) de los animales al momento del tratamiento de sincronización de la ovulación. En este estudio fueron evaluadas 1.987 IATFs realizadas en vacas Nelore tratadas o no con eCG al momento del retiro del dispositivo. Se verificó un efecto positivo del tratamiento con eCG solamente en los animales con condición corporal (CC) ≤ 3 . En animales con buena condición corporal (> 3) no fue constatado efecto positivo de la eCG sobre las tasa de concepción. La CC está frecuentemente relacionada a la ciclicidad^(25, 63). Asimismo, animales con buena CC presentan alta tasa de ciclicidad, lo que evita el tratamiento con eCG, conforme fue discutido anteriormente.

Para verificar si el tratamiento con eCG el momento del retiro del dispositivo de P4 interfiere en el intervalo entre el retiro y la ovulación, lo que podría afectar los resultados de la IATF, se realizaron una secuencia de experimentos. Los resultados de estas investigaciones demostraron que el tratamiento con eCG al retiro del dispositivo con P4 no influencia el intervalo entre el retiro y la ovulación en las categorías estudiadas, sugiriendo que vacas que reciben eCG deben ser inseminadas en el mismo momento que las vacas que no la recibieron.

Esa secuencia de estudios sugiere que la eCG tiene efecto positivo solamente en animales en anestro. Eso se debe, probablemente a la ausencia de pulsatilidad de LH adecuada para promover el crecimiento folicular del folículo dominante y para crear condiciones de ovulación al final del protocolo de sincronización. Por la acción prolongada (~3 días) de FSH y LH luego del tratamiento con eCG, el comprometimiento de la liberación de LH sería minimizado y el folículo dominante tendría condiciones de crecer y ovular. En el caso de vacas que presentan condiciones fisiológicas de liberación adecuada de LH (vacas ciclando y en buena condición corporal) el tratamiento con eCG se torna innecesario.

En otros estudios observamos que los animales que recibieron eCG presentaron mayores concentraciones plasmáticas de P4 en el diestro siguiente al protocolo de sincronización de la ovulación (Tabla 2). Estos datos sugieren que el aumento en la tasa de concepción luego del tratamiento con eCG puede también ser debido a una elevación en las concentraciones plasmáticas de P4. Mann y Lamming⁽³⁴⁾ demostraron que vacas que presentan mayores concentraciones de P4 en el diestro presentan mejores condiciones de crecimiento

Tabla 2. Concentración plasmática de progesterona (ng/mL) luego de la ovulación sincronizada en animales tratados o no con eCG.

	Nº animales (categoría)	Día [P4] luego de la ovulación	Sin eCG	Con eCG
Baruselli y col. (2000c)	59 (receptoras)	Día 7	1,4 \pm 0,8 ^a	4,2 \pm 3,7 ^b
Marques y col. (2003)	50 (vacas ½ sangre)	Día 12	6,4 \pm 0,5 ^a	8,6 \pm 0,4 ^b
Baruselli y col. (2004a)	41 (Vaq. Nelore)	Día 12	2,2 \pm 0,2 ^a	4,3 \pm 0,6 ^b
Sá filho y col. (2005)	172 (Vaq. Nelore)	Día 5	3,6 \pm 0,7 ^a	6,6 \pm 1,0 ^b

embrionario y de reconocimiento materno de la gestación, culminando en mayores tasas de concepción. En Brasil, ya existen trabajos que también reportan correlación positiva entre la concentración plasmática de P4 y la tasa de concepción en receptoras de embriones bovinos^(9, 48).

Asimismo, como se observó en bovinos, otros estudio realizado por nuestro grupo de investigación en hembras bubalinas observó mayor diámetro del CL y mayor concentración de P4 en el diestro siguiente a la IATF realizada en contra estación⁽²²⁾. También, los mismos autores demostraron que las hembras bubalinas sometidas a protocolos de IATF con la adición de eCG presentaron mayor tasa de preñez (52,7%; 68/129) comparadas con las no tratadas con eCG (39,4%, 50/127; P = 0,03).

Tal como citáramos anteriormente, Sá Filho y col.^(20, 13) también observaron efectos positivos del tratamiento con eCG en el desarrollo luteal en el diestro siguiente. En tanto, los mismos autores también observaron mayor ocurrencia de celos en hembras tratadas con eCG [eCG: 63,7% (55/86) vs. Control: 46,4% (40/86); P=0,03], como así también mayor tasa de ovulación [eCG: 96,7% (83/86) vs. Control: 82,6% (71/86); P=0,03]. En otro estudio, Pitaluga y col.⁽⁴⁶⁾ observaron que la administración concomitante de eCG y de Cipionato de estradiol, en el momento de la retirada del implante con P4, produjo mayor ocurrencia de estro (56,3%; 18/32) que en el grupo control (16,1%; 5/31) o tratadas solo con eCG (24,2, 8/33; P < 0,05). También, hembras del grupo CE+eCG presentaron mayor tasa de preñez (50,4%; 62/123) comparado con hembras del grupo Control (29,5%; 38/129), siendo el grupo eCG intermedio (41,8%, 56/134; P = 0,002).

Un estudio reciente fue conducido para evaluar el efecto de la eCG en la respuesta folicular ovárica, en el desarrollo del CL y también en el tamaño del conceptus 16 días después de la IATF⁽⁴⁵⁾. Los autores observaron mayor tasa de crecimiento del folículo dominante entre los días 8 y 10 pos IATF (Control: $2,6 \pm 0,2$ vs. eCG: $3,5 \pm 0,3$ mm/día; $P = 0,03$) y mayor diámetro (Control: $17,9 \pm 0,4$ vs. eCG: $19,6 \pm 0,3$ mm; $P = 0,003$) y peso del CL (Control: $2,4 \pm 0,1$ vs eCG: $2,8 \pm 0,1$; $P = 0,04$) 26 días luego de la IATF en los animales tratados con eCG. Finalmente, la longitud del conceptus observado al día 16 pos IATF fue $98,1 \pm 17,2$ mm en el grupo control y $118,5 \pm 21,8$ mm en el grupo eCG ($P = 0,23$).

Asimismo, se puede suponer que el aumento de la tasa de concepción en hembras bovinas tratadas con eCG puede estar relacionado a: 1) incremento en la tasa de ovulación, principalmente en animales en anestro, y; 2) aumento de las concentraciones plasmáticas de P4 en el diestro del ciclo siguiente a la IATF, que puede mejorar el desarrollo embrionario y de mantención de la gestación.

3.1 Reducción del intervalo entre el parto y la IATF empleando tratamiento con eCG

El intervalo entre partos recomendado zootécnicamente es de aproximadamente 12 meses. Para alcanzar este índice, las vacas deben preñarse rápidamente luego del parto (entre 70 y 90 días). Asimismo, para alcanzar esta meta de 12 meses, las vacas necesitan ser sincronizadas e inseminadas precozmente. Con el objetivo de reducir el intervalo entre el parto y la IATF estudiamos⁽²⁾ el efecto de la eCG dependiendo del período pos parto y CC.

En este estudio, se observó un aumento en la tasa de concepción a la IATF en animales tratados con eCG en el período pos parto precoz (entre 30 y 60 días), independientemente del estado de CC. En tanto que el efecto positivo de la eCG en animales con $CC \geq 3,0$ desapareció conforme aumentó el período pos parto (Figura 2). Los datos son indicativos de que cuando el tratamiento de sincronización de la ovulación para IATF es realizado antes de los 60 días pos parto se sugiere la utilización de eCG en todos los animales, independientemente de su estado de CC.

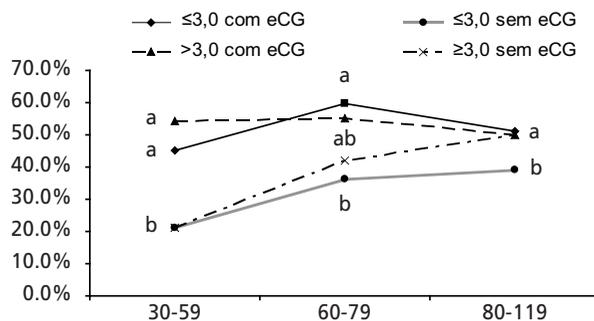


Figura 2. Distribución de la tasa de concepción conforme al período pos parto, al estado de CC y tratamiento con eCG en vacas Nelore inseminadas a tiempo fijo (n=617).

Los trabajos científicos presentados son indicativos de que es posible sincronizar eficientemente el crecimiento folicular y la ovulación para IATF durante el período pos parto. El tratamiento con benzoato de estradiol (EB) asociado a un dispositivo de progesterona o progestágeno sincroniza la emergencia de una onda de crecimiento folicular 3 a 4 días luego del tratamiento. Los folículos crecen por acción de FSH y, luego de la divergencia, en presencia de concentraciones adecuadas de LH adquieren diámetros compatibles con altas tasas de ovulación. En tanto, en vacas en anestro, debido a la baja pulsatilidad de la LH se verifica el comprometimiento del crecimiento folicular y baja tasa de ovulación al final del protocolo de sincronización con dispositivos con progesterona o progestágenos. En esta condición, el tratamiento con eCG proporciona soporte gonadotrófico para impedir la atresia del folículo dominante, estimular el crecimiento folicular y promover la ovulación. Asimismo, el efecto positivo del tratamiento con eCG en protocolos de IATF es dependiente del grado de ciclicidad del rodeo. Vacas en anestro necesitan de eCG para estimular el crecimiento folicular y crear condiciones de ovulación al final del protocolo. En tanto, vacas ciclando (con liberación adecuada de LH), presentan condiciones fisiológicas para poder responder con altas tasas de ovulación al final del tratamiento de sincronización sin la necesidad del tratamiento con eCG.

3.2 Uso de eCG para IATF en vacas Holstein de alta producción

Las vacas de leche de alta producción presentan mayor tasa de ciclicidad que las vacas de carne criadas a pasto. Probablemente debido a esa característica, los trabajos realizados no evidenciaron

aumento en la tasa de ovulación luego de un tratamiento con eCG en vacas Holstein en lactación^(56,57). Sin embargo, se verificó, al igual que en vacas y vaquillonas de carne, un aumento en las concentraciones de P4 en el diestro siguiente al tratamiento con eCG. La eCG parece estar aumentando la capacidad esteroideogénica del CL en una fase crítica del desarrollo embrionario, minimizando fallas en el reconocimiento fetal de la gestación, las vacas lecheras de alta producción poseen un alto metabolismo hepático de los esteroides⁽⁵⁴⁾.

La tasa de concepción a la IATF de las vacas Holstein varió conforme al tratamiento, condición corporal. Los animales de menor CC (<2,75) que no recibieron eCG al final del protocolo hormonal, presentaron bajas tasas de concepción comparado con los animales de menor CC tratadas con eCG (Figura 3). En los animales con CC superior a 2,75 no se verificó efecto positivo del tratamiento con eCG⁽⁵⁸⁾.

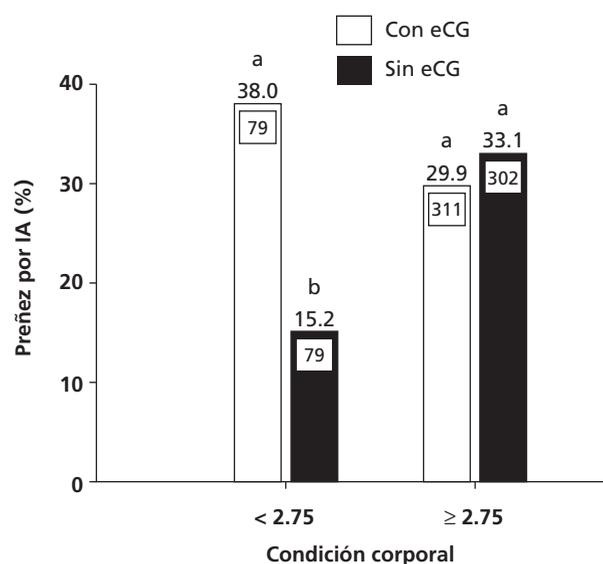


Figura 3. Tasa de concepción para animales con condición corporal <2,75 y ≥2,75 (escala de 1 a 5) conforme tratamiento o no con eCG. Letras diferentes entre columnas difieren estadísticamente; P< 0,05⁽⁵⁸⁾.

Finalmente, en pro de dilucidar un posible efecto dosis dependiente de la eCG en vacas Holstein de alta producción, otro estudio fue realizado para evaluar la respuesta folicular, el desarrollo del CL y la tasa de preñez en hembras tratadas (400 o 600 UI) o no con eCG⁽²⁶⁾. Sin embargo, independientemente de la dosis de eCG, no fue observada diferencia en la respuesta folicular, en el desarrollo folicular ni en las tasas de preñez en vacas Holstein tratadas con eCG. A pesar de estos resul-

tados conflictivos, estudios demostraron efecto positivo de la eCG en vacas de leche con baja CC⁽⁵⁷⁾, en anestro pos parto⁽²⁷⁾ y en animales sincronizados en el período pos parto temprano⁽¹⁾.

4. Superovulación de donantes de embriones con eCG

En el protocolo tradicional de superovulación (SPO), el tratamiento con gonadotrofinas es iniciado en la mitad del ciclo estral (8 a 12 días luego de la ovulación). Esta metodología presenta algunas dificultades por requerir detección de celos para el inicio del tratamiento superovulatorio⁽³⁶⁾. Existen alternativas para el control de la emergencia de una onda de crecimiento folicular en momentos aleatorios del ciclo estral, sin la necesidad de detección de celos tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*, como así también para aumentar la eficiencia de los programas de transferencias de embriones^(14, 16).

El tratamiento elegido para la inducción de la emergencia de una nueva onda folicular es realizado con la asociación de estradiol (E2) y P4. La eficiencia de esta asociación ha sido descrita en diversos trabajos en hembras *Bos taurus*^(17, 20, 23). Nuestro grupo de investigación ha estudiado el efecto del tratamiento con E2 y P4 en la emergencia de la onda folicular en *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* y *Bos taurus* mantenidas en las mismas condiciones de manejo⁽²¹⁾. No fue observada diferencia en el intervalo entre el tratamiento con benzoato de estradiol (EB) y la emergencia de la onda folicular entre *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* y *Bos taurus* (3 a 4 días).

4.1 Uso de eCG para superestimulación

Evaluamos la hipótesis de que es posible obtener resultados satisfactorios mediante el uso de eCG para superovulación, asociado a un protocolo de sincronización de la onda de crecimiento folicular y de la ovulación en donantes Nelore y Holstein. Un total de 12 donantes Nelore⁽⁴¹⁾ fue dividido en tres grupos: eCG-2500UI; eCG-2000UI y FSH-100mg (cross-over; 36 superovulaciones). Los animales recibieron un dispositivo de P4 asociado a 2 mg de EB en el Día 0. En los tratamientos con eCG (Novormon, Syntex), la superestimulación fue realizada con una administración única de 2500 o 2000 UI de eCG en el Día 4. En el tratamiento con FSH, se administró 100 mg de

Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 horas, a partir del Día 4. En el Día 6, se administró PGF. Los dispositivos fueron retirados 36 horas después de la administración de la PGF, y la LH se aplicó 48 horas luego de la PGF (Día 8). Se realizó una única inseminación 16 horas luego del tratamiento con LH. La colecta de embriones fue realizada en el Día 15. No fueron observadas interacciones, siendo los efectos de los tratamientos eCG-2500UI; eCG-2000UI yFSH-100mg, presentados en la Tabla 3. El tratamiento con 2000UI de eCG produjo un número semejante de embriones transferibles comparado con el grupo tratado con FSH.

Tabla 3. Efecto del tratamiento superovulatorio con diferentes dosis de eCG sobre la eficiencia de programas de TE con inseminación artificial a tiempo fijo en vacas Nelore (*Bos indicus*), Poços de Caldas, 2006.

	FSH (100mg)	eCG (2000 UI)	eCG (2500 UI)	Valor P
Nº de animales	12	12	12	
Nº de fol. >8mm (LH)	11,2 ± 2,7b	18,4 ± 2,9ab	24,4 ± 3,9 ^a	0,01
Tasa de ovulación (%)	65,9 (89/135) ^a	58,4 (129/221) ^a	33,1 (97/293) ^b	<0,001
No de CL (D15)	7,4 ± 1,5	9,1 ± 1,5	8,1 ± 1,1	0,68
Tasa recuperación	77,5 (69/89)	70,5 (91/129)	73,2 (71/97)	0,93
Total estructuras	5,7 ± 1,4	7,6 ± 1,0	5,9 ± 1,0	0,50
Embr. Transferibles	4,6 ± 0,9	6,9 ± 1,0	4,4 ± 0,7	0,08
Embr. Congelables	4,2 ± 0,8ab	6,7 ± 1,0a	3,8 ± 0,7b	0,03

En un experimento reciente⁽¹²⁾, evaluamos el efecto de la eCG en la respuesta superovulatoria en donantes Holstein (*Bos taurus*). Un total de 12 vacas fue dividido en tres grupos de acuerdo al tratamiento superovulatorio: 200mg FSH, 2000UI eCG y 2500UI eCG. Se usó el mismo lineamiento experimental que para el estudio anterior en donantes Nelore. Los resultados están presentados en la Tabla 4. A pesar de que el grupo 2000UI presentó menor número de CLs que el grupo 200mg FSH, no hubo diferencias significativas en la producción de embriones entre los tratamientos, indicando que es posible también superovular donantes Holstein con dosis únicas de eCG.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de sucesivos tratamientos con eCG en la producción de embriones, realizamos un experimento con 10 donantes Nelore superovuladas por 4 veces consecutivas con intervalo de 35 días⁽⁴⁰⁾. El grupo Control (n=10) fue superovulado simultá-

Tabla 4. Efecto de la eCG (2000UI e 2500UI) sobre la respuesta superovulatorio en vacas Holstein (*Bos taurus*) inseminadas a tiempo fijo, Poços de Caldas-MG (Adaptado de Martins y col.,⁴⁰).

	200 mg FSH	2000 UI eCG	2500 UI eCG	P
Número de animales	12	12	12	
Nº de CLs en D15	13,42 ± 1,26 ^a	9,91 ± 1,29b	12,3 ± 1,18ab	0,04
Total de estructuras	9,58 ± 1,21	7,67 ± 0,98	10,41 ± 0,82	0,10
Emb. Transferibles	7,92 ± 1,05	6,67 ± 1,07	8,08 ± 0,74	0,35
Emb. Congelables	7,00 ± 1,06	6,33 ± 1,09	6,75 ± 0,51	0,57

neamente con FSH. Se comprobó que hasta el tercer tratamiento superovulatorio, las vacas del grupo eCG produjeron cantidades similares de embriones en relación a la primera superovulación, comparado con las vacas del grupo FSH. Sin embargo, a partir del cuarto tratamiento superovulatorio el grupo eCG produjo menores cantidades de embriones transferibles. Debido a esta significativa reducción en la producción de embriones a partir del cuarto tratamiento con eCG, las donantes de este grupo fueron superovuladas por última vez con FSH. Se confirmó que las donantes volvieron a producir cantidades semejantes de embriones al grupo control. Los resultados se encuentran presentados en la Figura 4. Estos datos son sugestivos de que es posible superovular donantes con eCG por veces consecutivas. A partir de la cuarta superovulación, los animales deberían ser superovuladas con FSH. Nuevos trabajos deben ser realizados para confirmar la duración del efecto negativo de la superovulación continua con eCG.

Por lo tanto, los resultados de las investigaciones aquí presentadas son indicativos de que es posible utilizar eCG para superovular donantes *Bos indicus* y *Bos taurus*.

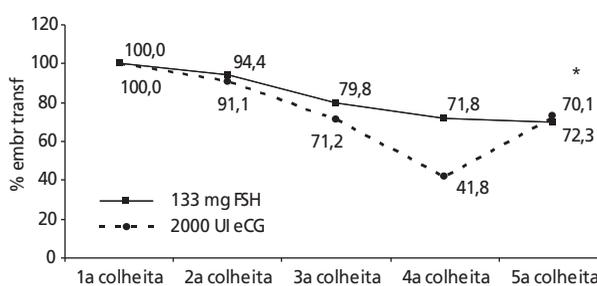


Figura 4. Porcentual del número de embriones transferibles (grado 1, 2 y 3) en relación a la primera colecta en donantes Nelore (*Bos indicus*) superovuladas por 4 veces (intervalo de 35 días) con FSH (n=10) o con eCG (n=10) e inseminadas a tiempo fijo. *En el quinto tratamiento superovulatorio todos los animales fueron superovulados con FSH.

5. Programas de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)

Algunos investigadores demostraron que las tasas de aprovechamiento son mayores en receptoras sometidas a protocolos de TETF que aquellas tratadas con una o dos dosis de PGF con posterior detección de celos^(4, 6, 19, 50, 61). Como las tasas de concepción de tales protocolos son similares a las de receptoras tratadas exclusivamente con PGF, debido a un aumento en la tasa de aprovechamiento (número de animales trasferidos/ número de animales tratados), mayor porcentaje de preñez son obtenidos en programas de TETF. También, es posible programar el día de la TE utilizando programas de TETF, evitando la necesidad de detectar celos.

5.1 Uso de eCG en la formación de CLy en la producción de P4 en receptoras *Bos taurus* x *Bos indicus*

La relación entre la tasa de concepción, la concentración plasmática de P4 y el tamaño del CL en receptoras de embriones bovinos es controvertida en diferentes estudios. Varios investigadores han comprobado correlación positiva entre tales variables. De acuerdo con Vasconcelos y col.⁽⁶²⁾, cuanto mayor es el volumen del CL, mayor será la concentración de P4 y consecuentemente, mayor tasa de concepción será obtenida en vacas IATF. Estos hallazgos se corroboran con un experimento realizado por nuestro grupo⁽⁶⁾, en el cual se confirmó que el área del CL está asociada a la concentración plasmática de P4 y a la tasa de concepción en receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de progesterona y tasa de concepción conforme al área del cuerpo lúteo en el día 6 do ciclo estral en receptoras de embriones bovinos (*Bos indicus* x *Bos taurus*).

Área do CL (ultrasonografía)	Número de receptoras	Concentración de P4 (ng/ml)	Área media (cm ²)	(%) Tasa de concepción
CL1 (> 2,0 cm ²)	77	2,44 ± 0,86 ^a	2,66 ± 0,51	58,4 (47/77) ^d
CL2 (1,5 a 2,0 cm ²)	41	1,75 ± 0,69 ^b	1,74 ± 0,10	41,5 (17/41) ^e
CL3 (< 1,5 cm ²)	22	0,96 ± 0,56 ^c	1,19 ± 0,20	31,8 (7/22) ^e

(a ≠ b ≠ c; P < 0,01 e d ≠ e; P < 0,05).

Otros trabajos confirmaron la relación positiva entre la concentración plasmática de P4 y la tasa de concepción⁽⁴⁸⁾. Los datos son indicativos de que receptoras con menores concentraciones de P4 en el día de la TE presentan menores tasas de concepción. El aumento en las concentraciones de P4

en el diestro fue correlacionado con el crecimiento embrionario, por el mayor aporte de nutrientes para el lumen uterino^(15, 28), y con su capacidad para secretar interferón- τ ^(31, 34, 35). La secreción de interferón- τ está correlacionada con la disminución en la secreción de PGF $_{2\alpha}$ por endometrio uterino y el bloqueo de la luteólisis^(33, 34, 64). Este fenómeno fue asociado al aumento de las tasas de concepción en bovinos^(6, 32). Entre tanto, algunos investigadores no observaron ese efecto^(43, 59).

En otro experimento realizado por nosotros con el objetivo de tratar receptoras con eCG al inicio de la onda de crecimiento folicular para TETF^(6, 7), se confirmó una relación positiva entre el número de CL, la concentración de P4 y la tasa de concepción luego de la TE de embriones congelados en etilenglicol. En este estudio fueron utilizadas vaquillonas mestiza *Bos taurus* x *Bos indicus* (Tabla 6).

Tabla 6. Número medio de CL, concentración plasmática de progesterona (P4) y tasas de preñez en receptoras *Bos taurus* x *Bos indicus* tratadas con dispositivos CIDR-B + Estradiol/progesterona en el Día 0, con o sin 800 UI de eCG en el Día 5 y TETF.

Grupo	N	Nº CL	P4 (ng/ml)	Tasa de aprov. (%)	Tasa conc. (%)	Tasa preñez (%)
Control	50	0,5 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,8 ^a	17/50 (34,0) ^a	5/17 (29,4) ^c	5/50 (10,0) ^a
eCG	50	2,6 ± 2,9 ^b	4,2 ± 3,7 ^b	42/50 (84,0) ^b	21/38 (55,3) ^d	21/50 (42,0) ^b

^a^bLos porcentajes en las columnas con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

^c^dLos porcentajes en las columnas con diferente superíndices difieren (P= 0,07)

Asimismo, el tratamiento con eCG en el momento de la emergencia de la nueva onda de crecimiento folicular fue eficaz para superestimular las receptoras. Además de mayor número de CL (o un CL mayor), mayor concentración de P4 y mayores tasas de aprovechamiento, concepción y preñez fueron encontradas. Utilizando eCG, Bó y col.⁽¹⁹⁾ evaluaron un protocolo semejante (n= 312), y comprobaron que la utilización de 400 UI en el momento de la emergencia de la nueva onda folicular resultó en apenas un 2 % de ovulaciones dobles en receptoras cruzas cebú. En tanto, que ese tratamiento formó CL únicos, mayores e incrementó la tasa de concepción (41,7% vs. 57,6%, P<0,02) y de preñez (33,9% vs. 48,7%, P<0,02).

En una secuencia de experimentos, diferentes dosis de eCG (400 vs 500 vs 600 UI) fueron evaluadas en protocolos de transferencias de embrio-

nes a tiempo fijo ⁽⁴⁷⁾. En el presente estudio no fue observado efecto de la dosis de eCG sobre la eficiencia de los protocolos empleados (n= 600 receptoras nulíparas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus*), indicando que la dosis de 400UI de eCG es suficiente para la obtención de resultados satisfactorios en receptoras de embriones tratadas con un protocolo para TETF.

6. Conclusiones

Los trabajos de investigación presentados relatan la importancia del uso de eCG para aumentar la eficiencia de los protocolos de sincronización para inseminación artificial, superovulación y transferencia de embriones a tiempo fijo. Para la correcta utilización de este fármaco, cabe el técnico responsable analizar las condiciones fisiológicas del rodeo a la hora de tomar decisiones.

7. Bibliografía

1. Ayres, H. 2011. O uso de FSH exógeno estimula o crescimento folicular final e a função luteínica de vacas Holandesas em lactação sincronizadas para Inseminação Artificial em Tempo Fixo?, Universidade de São Paulo, São Paulo.
2. Ayres, H. et al. 2007. Influência do uso de eCG em diferentes períodos pós parto e do escore de condição corporal na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. In: XXI Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões
3. Baruselli, P. et al. 2004a. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva). In: XVIII Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, Barra Bonita. p 228.
4. Baruselli, P. et al. 2000a. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "oovsynch" com inovulação em tempo fixo. p 216.
5. Baruselli, P. et al. 2000b. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. p 217.
6. Baruselli, P. et al. 2000c. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de p4 e taxa de prenhez. . p 218.
7. Baruselli, P. et al. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with cidr-b devices. *Theriogenology* 55: 355.
8. Baruselli, P., E. Reis, N. Carvalho, and J. Carvalho. 2004b. eCG increases ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: XIV international congress on animal reproduction, Porto Seguro. p 117.
9. Baruselli, P. S. et al. 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 67-74.
10. Baruselli, P. S. et al. 2003. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40: 96-106.
11. Baruselli, P. S., M. O. Marques, N. A. T. Carvalho, E. H. Madureira, and E. P. Campos Filho. 2002. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 26: 218-221.
12. Baruselli, P. S., C. M. Martins, J. N. S. Sales, and R. M. Ferreira. 2008. Recent advances in bovine superovulation. *Acta Sci Vet* 36: 433-448.
13. Baruselli, P. S., E. L. Reis, M. O. Marques, L. F. Nasser, and G. A. Bó. 2004c. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* 82-83: 479-486.
14. Baruselli, P. S. et al. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65: 77-88.
15. Binelli, M., W. W. Thatcher, R. Mattos, and P. S. Baruselli. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56: 1451-1463.
16. Bó, G. A., P. S. Baruselli, P. Chesta, and C. M. Martins. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65: 89-101.
17. Bo, G. A., G. P. Adams, R. A. Pierson, and R. J. Mapletoft. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43: 32-40.
18. Bó, G. A., P. S. Baruselli, and M. F. Martinez. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78: 307-326.
19. Bó, G. A. et al. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72.
20. Bo, G. A., R. A. Pierson, and R. J. Mapletoft. 1991. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cow with syncro-mate-b implants. *Theriogenology* 36: 169-183.
21. Carvalho, J. B. P. et al. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos*

- indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69: 167-175.
22. Carvalho, N. A. T. et al. 2013. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology* 79: 423-428.
 23. Colazo, M. G., J. P. Kastelic, and R. J. Mapletoft. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 60: 855-865.
 24. Cutaia, L., G. Veneranda, R. Tribulo, P. S. Baruselli, and G. A. Bó. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos V Simposio Internacional de Reproducción Animal No. 25-27 p119-132, Argentina.
 25. D'occhio, M., A. Neish, and L. Broadhurst. 1990. Differences in gonadotrophin secretion post-partum between zebu and european breed cattle. *animal reproduction science*. *Animal Reproduction Science* 22: 311-317.
 26. Ferreira, R. et al. 2013. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Animal Reproduction Science*.
 27. Garcia-Ispierto, I., I. López-Helguera, A. Martino, and F. López-Gatiús. 2011. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. *Reproduction in Domestic Animals: no-no*.
 28. Geisert, R., G. Morgan, E. Short, and M. Zavy. 1992. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development* 4: 301-305.
 29. Hasler, J. F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415.
 30. IETS. 2012. International embryo transfer society. Statistics and data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter* 30: 16-26.
 31. Kerbler, T., M. Buhr, L. Jordan, K. Leslie, and J. Walton. 1996. Relationship maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714.
 32. MacMillan, K., and A. Peterson. 1994. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (cidr-b) for estrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *animal reproduction science* 33: 1-25.
 33. Mann, G. E., and G. E. Lamming. 1995. Effect of the level of oestradiol on oxytocin-induced prostaglandin F₂α release in the cow. *Journal of Endocrinology* 145: 175-180.
 34. Mann, G. E., and G. E. Lamming. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim* 34: 269-274.
 35. Mann, G. E., and G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows *Reproduction* 121: 175-180.
 36. Mapletoft, R. J., K. B. Steward, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42: 601-611.
 37. Marques, M., E. Reis, E. Campos Filho, and P. Baruselli. 2003. Efeitos da administração de ecg e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: 5º simposio internacional de reproducción animal, Córdoba. p 392.
 38. Marques, M., E. Reis, J. Mello, E. Campos Filho, and P. Baruselli. 2004. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas nelore lactantes.
 39. Marques, M. et al. 2005. Efeito do tratamento com pgf_{2a} na inserção e/ou tratamento com ecg na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore, Angra dos Reis. p 287.
 40. Martins, C. M. et al. 2008. Efeito da redução do número de administrações de fsh na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *acta sci vet*.
 41. MARTINS, C. M., J. R. S. TORRES-JÚNIOR, A. H. SOUZA, and P. S. BARUSELLI. 2006. Resposta superovulatória e produção de embriões de doadoras Nelore (*Bos indicus*) submetidas à indução da ovulação com GnRH ou LH para inseminação em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet.* 34: 227.
 42. Murphy, B. D., and D. Martinuk. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews* 12: 27-44.
 43. Nogueira, M. et al. 2004. Do high progesterone concentrations in embryos recipients synchronized with pgf_{2a} and ecg? *Theriogenology* 61: 1283-1290.
 44. Penteado, L., H. Ayres, E. H. Madureira, E. L. Reis, and P. S. Baruselli. 2004. Efeito do ecG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae* 32: 223.
 45. Pitaluga, P. et al. 2013a. Effects of equine chorionic gonadotrophin on follicular, luteal and conceptus development of non-lactating *Bos indicus* beef cows subjected to a progesterone plus estradiol-based timed artificial insemina-

- tion protocol. Italian Journal of Animal Science 12: e61.
46. Pitaluga, P., M. Sá Filho, J. Sales, P. Baruselli, and L. Vincenti. 2013b. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. *Livestock Science*.
 47. Reis, E. 2004. Adequação da dose e do momento da administração de ecg no protocolo de sincronização de receptoras de embrião bovino. Tese de Mestrado.
 48. Reis, E. et al. 2004. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da inovulação. p 88.
 49. Rodrigues, C., H. Ayres, E. Reis, E. Madureira, and P. Baruselli. 2004. aumento da taxa de prenhez em vacas nelore inseminadas em tempo fixo com uso de ecg em diferentes períodos pós-parto. In: XVIII reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, Barra Bonita. p 220.
 50. Rodrigues, C. A. et al. 2010. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 118: 110-117.
 51. Sá Filho, M. et al. 2013. Different hormonal stimulus during synchronized proestrus alter the ovarian follicle responses and subsequent luteal function in suckled anestrous zebu cows. *Animal Reproduction* 10: 470.
 52. Sá filho, M., L. Penteadó, E. Reis, L. Gimenes, and P. Baruselli. 2005. Efeito da ciclicidade e do tratamento com ecg na dinâmica folicular na taxa de concepção de novilhas nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol, Angra dos Reis. p 265.
 53. Sales, J. N. S., G. A. Crepaldi, R. W. Giroto, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Animal Reproduction Science* 124: 12-18.
 54. Sartori, R., G. J. M. Rosa, and M. C. Wiltbank. 2002. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85: 2813-2822.
 55. Silva, R. et al. 2004. Efeito do ecg e do gnrh na taxa de prenhez de vacas nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. In: XVIII reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, Barra Bonita. p 221.
 56. Souza, A., C. Martins, J. Torres Junior, H. Ayres, and P. Baruselli. 2006. Efeito do ecg e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. In: I simpósio de pesquisa e pós-graduação do departamento de reprodução animal, Pirassununga
 57. Souza, A. H., H. Ayres, R. M. Ferreira, and M. C. Wiltbank. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70: 208-215.
 58. Souza, A. H. et al. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10-21.
 59. Spell, A. R., W. E. Beal, L. R. Corah, and G. C. Lamb. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 56: 287-297.
 60. Stewart, F., and W. Allen. 1981. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *Journal of reproduction and fertility* 62: 527-536.
 61. Tribulo, H. et al. 2000. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and cidr-b vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. . In: 14th international congress on animal reproduction, stockholm. p 115.
 62. Vasconcelos, J. L. M., R. Sartori, H. N. Oliveira, J. G. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.
 63. Viscarra, J., R. Wettermann, J. Spitzer, and D. Morrison. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *Journal Animal Science* 76: 493-500.
 64. Wathes, D., R. Robinson, G. Mann, and G. Lamming. 1998. The establishment of early pregnancy in cows. *reproduction domestic animals* 33: 279-284.