

MARIA PAULA BELTRAN

**EFEITO DO TRATAMENTO COM GnRH OU hCG NO
DIA 5 PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SOBRE A
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA E A
TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS HOLANDESAS
LACTANTES DURANTE O VERÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária –
Área de Concentração: Reprodução Animal.

Botucatu – SP

2003

MARIA PAULA BELTRAN

**EFEITO DO TRATAMENTO COM GnRH OU hCG NO
DIA 5 PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SOBRE A
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA E A
TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS HOLANDESAS
LACTANTES DURANTE O VERÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária –
Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Botucatu – SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Beltran, Maria Paula.

Efeito do tratamento com GnRH ou hCG no dia 5 pós inseminação artificial sobre as taxas de concepção em vacas holandesas lactantes durante o verão / Maria Paula Beltran. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal - Aspectos endócrinos

CDD 636.0824

Palavras-chave: Vacas leiteiras; Concepção; Progesterona; hCG; GnRH

Dedico este trabalho aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos, pela oportunidade.

Ao Professor Dr. Ciro Moraes Barros pelas inúmeras colaborações durante o transcorrer deste trabalho.

Ao Professor Francisco Stefano Wechsler, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus professores da UFMS, principalmente ao Rafael de Rossi pelo primeiro incentivo, ao Paulo Antonio Terabuio Andreussi, pelo estímulo em prosseguir com a Pós-Graduação e ao Alfredo Sampaio Carrijo, que sempre ajudou e aconselhou para que o caminho fosse menos longo e difícil.

Aos professores do departamento de Reprodução Animal da FMVZ Botucatu, especialmente Sony Dimas Bicudo e Eunice Oba, por sempre se colocarem a disposição, ajudando e orientando.

Ao serviço de Ornitopatologia, por disponibilizar o uso dos laboratórios, e principalmente à professora Ligia Pedroso Boretti pela autorização e ao funcionário Luiz Antonio Matiazzi, pela ajuda.

Aos professores Luiz Edvaldo Pezzato e Antonio Celso Pezzato pela ajuda constante e pelos conselhos, sempre úteis

Aos funcionários do DPEA, Solange e Barbosa, pela disponibilidade e ajuda.

Às bibliotecárias Nivaldete Costa Fernandes Cruz, pela correção das referências bibliográficas, e Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.

Ao colega da Pós Graduação Andrey Borges Teixeira, pela ajuda constante durante o transcorrer deste trabalho, e principalmente pela colaboração com a realização do radioimunoensaio.

Aos colegas de Pós-graduação Fábio, pela colaboração com os Radioimunoensaios, e Ricarda, pela ajuda.

À Christianne Barreto, pela companhia durante os cafezinhos, pela ajuda e principalmente pela amizade.

Ao Wagner Garcia, verdadeiro amigo desde a graduação, pela compreensão, ajuda e amizade.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

E, principalmente, ao Paulo, que com seu amor e carinho entendeu todos os momentos difíceis, sempre ao meu lado, me ajudando e incentivando.

Sinceramente,
Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Associação entre produção de leite e eficiência reprodutiva ..	17
3.2. Influência da concentração sérica de progesterona pós IA nas taxas de concepção	18
3.3. Efeitos do estresse térmico sobre a taxa de concepção	22
3.4. Utilização de GnRH ou hCG no dia cinco pós IA visando aumento na secreção de progesterona	25
4. HIPÓTESE	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Local e período de realização	33
5.2. Animais	33
5.3. Tratamentos	34
5.4. Colheita das amostras de sangue	35
5.5. Dosagem da progesterona sérica	36
5.6. Diagnóstico de gestação	37
5.7. Análise estatística	37
6. RESULTADOS	40
6.1. Concentração e aumento percentual da progesterona sérica..	40

6.2. Efeito da temperatura retal no momento da IA e dos tratamentos utilizados sobre a concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA	43
6.3. Interação entre a temperatura retal no momento da IA e os tratamentos com GnRH e hCG na taxa de concepção	46
6.4. Produção de leite e ordem de lactação	47
7. DISCUSSÃO	48
7.1. Concentração e aumento percentual da progesterona sérica	48
7.2. Efeito da temperatura retal no momento da IA e dos tratamentos utilizados sobre a concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA	51
7.3. Interação entre a temperatura retal no momento da IA e os tratamentos com GnRH e hCG na taxa de concepção	52
7.4. Produção de leite e ordem de lactação	56
8. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tratamentos realizados nas vacas no dia 5 pós IA.	35
Tabela 2. Momentos da colheita das amostras de sangue.....	35
Tabela 3. Concentração sérica de P4 (ng/ml) nos dias 5; 7 e 12 pós IA em vacas submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média±EPM).....	40
Tabela 4. Concentração sérica de P4 em vacas com temperatura retal < 39,7°C, submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média±EPM)	43
Tabela 5. Concentração sérica de P4 em vacas com temperatura retal ≥ 39,7°C, submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média±EPM)	44
Tabela 6. Taxas de concepção (%) conforme tratamento realizado no dia 5 pós IA e temperatura retal no momento da Ia (média±EPM)	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aumento percentual da concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA nos grupos Controle, GnRH e hCG, considerando a concentração sérica de P4 no dia 5 como 100%.	42
Figura 2. Aumento percentual da concentração sérica de progesterona nos dias 5, 7 e 12 pós IA em vacas com temperatura retal $<$ ou $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$, nos três grupos, considerando a concentração sérica de P4 no dia 5 como 100%	45

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

μ: micrograma

CL: Corpo lúteo

CLa: Corpo lúteo acessório

DPP: Dias Pós Parto

EPM: erro padrão da média

g: grama

g: gravidade

Graf: gráfico

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

IA: Inseminação Artificial

IFN-τ: Interferon-tau

IM: Intramuscular

IMS: Ingestão de Matéria Seca

Kg: quilograma

LH: hormônio luteinizante

ml: mililitros

ng: nanograma

P: nível de significância

P4: Progesterona

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

PGFM: 13,14-dihydro - 15-keto PGF_{2α}

Tab: tabela

UI: Unidade Internacional

Efeito do tratamento com GnRH ou hCG no dia 5 pós-inseminação artificial sobre a concentração sérica de progesterona e a taxa de concepção em vacas holandesas lactantes durante o verão

RESUMO: Este estudo avaliou o efeito de injeções de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) ou hCG (gonadotrofina coriônica humana) no dia 5 após inseminação artificial (IA) nas taxas de concepção em vacas lactantes durante o verão. Vacas holandesas, n=158, produzindo 26±9 kg de leite/dia e 213±112 dias pós-parto (DPP), foram aleatoriamente distribuídas em 3 grupos: Controle (GC; n=52); GnRH (GG; n=55), 100 mcg IM de gonadorelina (Cystorelin[®]); e hCG (GH; n=51), 2500 UI IM de hCG (Vetecor[®]). A temperatura retal foi verificada no momento da IA, e as amostras de sangue coletadas nos dias 5; 7 e 12 após IA para avaliar as concentrações séricas de progesterona (P4). A prenhez foi determinada entre os dias 42 e 49 após IA. Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS, e foram incluídos no modelo efeitos do tratamento, ordem de lactação, produção de leite, temperatura retal no momento da IA e suas interações. O tratamento com GnRH ou hCG aumentou a P4 sérica (P<0,01). As concentrações séricas de P4 (ng/ml; média ± EPM) para GC, GG, e GH foram, respectivamente, no dia 5: 2,71±0,43; 2,45±0,44 e 3,23±0,45, no dia 7: 4,79±0,43; 4,15±0,44 e 5,75±0,45, e no dia 12 após IA: 5,21±0,43; 6,91±0,44 e 8,50±0,45. Devido ao aumento proporcional na concentração sérica de P4 entre os dias 5 e 7 após IA (GC: 77, GG: 69, GH: 77%; P<0,01) é provável que os tratamentos não tenham induzido o efeito luteotrópico no CL existente, porém devido ao grande aumento na P4 sérica no dia 12 nos animais tratados (GG: 112, GH: 87%; P<0,01) em relação aos animais controle (GC: 16%; P=0,31), provavelmente houve a indução de um novo CL. A temperatura retal média das vacas no momento da IA foi de 39,7°C e o tratamento com GnRH ou hCG aumentou as taxas de concepção (média ± EPM) nas vacas com temperatura retal abaixo de 39,7°C (GC: 10,1±0,07, n=26; GG: 36,8±0,07, n=27; e GH: 32,8±0,09%, n=21; P<0,01), mas não tiveram efeito na concepção (média ± EPM) em vacas com temperatura acima de 39,7°C (15,2±0,08; n=26; 17,8±0,08, n=28; e 24,4±0,07%, n=30; P>0,15). Esses dados sugerem que o GnRH e hCG aumentam as taxas de concepção em vacas holandesas lactantes por aumentar as concentrações séricas de P4. Os efeitos positivos dos tratamentos não foram detectados em vacas com alta temperatura retal provavelmente devido a efeitos deletérios do estresse térmico na fertilização e desenvolvimento precoce do embrião. Vacas leiteiras, concepção, progesterona, hCG, GnRH.

Effect of treatment with GnRH or hCG on day 5 after artificial insemination on serum progesterone concentration and conception rates in lactating Holstein cows during the summer

ABSTRACT: This study evaluated the effect of GnRH (gonadotropin releasing hormone) or hCG (human chorionic gonadotropin) injection on day 5 after artificial insemination (AI) on conception rates in lactating dairy cows during the summer. Holstein cows, 158, producing 26 ± 9 kg milk/d and 213 ± 112 days in milk, were randomly assigned to one of 3 treatments groups: control (CG: n=52); GnRH (GG: n=55), injection of 100 mcg i.m. of gonadorelin (Cystorelin[®]) and hCG (HG: n=51), injection of 2500 UI hCG i.m. (Vetecor[®]). Rectal temperature was checked at the moment of AI and blood samples collected on days 5, 7 and 12 after AI to evaluate serum progesterone (P4) concentrations. Pregnancy was determined between 42 and 49 d after AI. Data were analyzed by the MIXED procedure of SAS and were included in the model the effects of treatment, parity, milk production, rectal temperature at the moment of AI and interactions. Treatment with GnRH or hCG increased serum P4 ($P < 0,01$). Serum P4 concentrations (ng/ml, mean \pm SEM) for CG, GG and HG were, respectively, on day 5 2.71 ± 0.43 , 2.45 ± 0.44 and 3.23 ± 0.45 , on day 7, 4.79 ± 0.43 , 4.15 ± 0.44 and 5.75 ± 0.45 and on day 12 after AI, 5.21 ± 0.43 , 6.91 ± 0.44 , 8.50 ± 0.45 . Due to the proportional increase in serum P4 concentration from d 5 to 7 after AI (CG: 77, GG: 69, HG: 77%, $P < 0,01$), it is likely that treatments did not have luteotropic effect on the existing CL, but due the higher increase in serum P4 on day 12 in the treated animals (GG: 112, HG: 87%; $P < 0,01$) in relation to the control group animals (GC: 16%; $P = 0,31$), probably induced the formation of a new CL. The average rectal temperature of cows at time of AI was $39,7^{\circ}\text{C}$. Treatment with GnRH and hCG increased conception rates (mean \pm SEM) in cows with rectal temperature below $39,7^{\circ}\text{C}$ (CG: 10.1 ± 0.075 , n= 26, GG: 36.8 ± 0.073 , n=27, HG: $32.8 \pm 0.088\%$, n=21; $p < .01$), but had no effect on conception (mean \pm SEM) in cows with temperature above $39,7^{\circ}\text{C}$ (15.2 ± 0.080 , n=26, 17.8 ± 0.085 , n=28, $24.4 \pm 0.074\%$, n=30, $p < .15$). These data suggest that GnRH and hCG increase conception rates in lactating Holstein cows by increasing serum P4 concentrations. The positive effects of treatments were not detected in cows with high rectal temperature probably because of the deleterious effects of thermal stress on fertilization and early embryo development.

Dairy cows, conception, progesterone, hCG, GnRH.

1. INTRODUÇÃO

Vacas leiteiras de alta produção apresentam taxas de concepção abaixo do desejado, levando a perdas econômicas (NEBEL e MCGILLIARD, 1993; TEFERA et al., 2001). Diante disso, deve-se buscar a otimização do desempenho reprodutivo, por ter influência direta na produção de leite por dia de vida útil da vaca, número de animais de reposição, diminuição dos custos e aumento dos ganhos genéticos. A otimização da eficiência reprodutiva é um dos fatores que mais contribui para melhorar a performance e lucratividade dos rebanhos leiteiros.

São vários os fatores que podem influenciar negativamente o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. A baixa concentração de progesterona (P4) tem sido citada como um dos fatores que explicam a menor concepção em vacas de leite, sendo que a produção de leite reduz a concentração de P4, devido maior ao “clearance” desse hormônio pelo fígado (PARR et al., 1993ab) em consequência da alta ingestão de matéria seca (IMS; VASCONCELOS, 1998).

Em vacas prenhes da raça Holandesa foi observado maior concentração de P4 pós-inseminação artificial (IA; FONSECA et al.,

1983; FOLMAN et al., 1973, 1979, 1990, MANN et al., 1995) e também que a administração de P4 após a IA estimulou o desenvolvimento do embrião, tornando-o mais maturo e funcional (GARRET et al., 1988). Estes dados sugerem que parte das perdas embrionárias possa ser devido à inadequada função luteínica materna (STAPLES e HANSEL, 1961; BULMAN e LAMMING, 1978; LUKASZEWSKA e HANSEL, 1980; WIELBOLD, 1988; LAMMING et al., 1989; THATCHER, 1994; TEFERA, et al., 2001).

De acordo com GEISERT et al. (1992); MANN e LAMMING (1995, 2001), o sucesso do reconhecimento materno da gestação depende da presença de um embrião bem desenvolvido, que produza quantidades suficientes de Interferon-Tau (IFN- τ), o que por sua vez depende da secreção materna de P4. Assim, a concepção pode ser influenciada por falhas na fertilização ou perdas embrionárias precoces.

A concepção também pode ser significativamente comprometida pela temperatura ambiente (WOLFENSON et al., 2000), sendo de 10 a 20% nos meses mais quentes, e de 40 a 60% nos meses mais frios (CAVESTANY et al., 1985). Vacas em lactação são mais sensíveis a altas temperaturas, devido ao calor gerado pelo

aumento no metabolismo associado à produção de leite (LUCY, 2001).

Visando aumentar a concentração de progesterona pós IA e potencialmente reduzir a incidência da morte embrionária precoce, algumas medidas são sugeridas, entre elas o uso de agentes gonadotrópicos como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH; (NAKAO et al., 1983; LEWIS et al., 1990) ou a gonadotrofina coriônica humana (hCG; WILTBANK et al., 1961; MORRIS et al., 1976; EDUVIE & SEGUIN, 1982; McDERMOTT et al., 1986; PRICE et al., 1989; SIANANGAMA e RAJAMAHENDRAN, 1992, 1996; SANTOS et al., 2001).

O uso desses agentes poderia aumentar a secreção de P4, devido ao efeito luteotrópico (KERBLER et al., 1997; SANTOS et al., 2001) e/ou indução de um corpo lúteo acessório (CLa; SCHMITT et al., 1996; SIANANGAMA e RAJAMAHENDRAN, 1992; 1996; FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; MARQUES, 2002).

De acordo com a hipótese de LOPEZ-GATIUS et al. (2002), existe uma relação positiva entre a presença do CLa e a manutenção da gestação. A aplicação de gonadotrofinas durante a fase lútea seria

uma estratégia para aumentar a concentração de P4 devido à formação de CLa (SCHIMITT et al., 1996a).

2. OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da aplicação de GnRH ou hCG no dia cinco pós IA na concentração sérica de P4 nos dias 5; 7 e 12 pós IA e na taxa de concepção de vacas holandesas lactantes no verão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Associação entre produção de leite e eficiência reprodutiva

A produção de leite tem sido associada à diminuição na eficiência reprodutiva. Vacas de leite de alta produção apresentam sua performance reprodutiva comprometida em função do atraso na atividade ovariana pós-parto e/ou redução na taxa de concepção (NEBEL & MCGILLIARD, 1993).

A produção de leite pode comprometer o desempenho reprodutivo através da redução da concentração de P4, e o mecanismo pelo qual vacas de alta produção apresentam menor concentração deste hormônio está relacionado à ingestão de matéria seca (IMS; correlação produção de leite e IMS = 0,88; HARRISON et al., 1990). Com o aumento na IMS haveria aumento do aporte sangüíneo para o sistema digestivo com maior “clearance” de P4 pelo fígado (PARR et al., 1993ab). VASCONCELOS (1998) verificou que existe efeito agudo da alimentação nos níveis de P4, sendo que com 3 horas após a ingestão de dieta completa foi detectado decréscimo na concentração deste hormônio, provavelmente devido ao maior “clearance” pelo

fígado. Para cada aumento de produção de um Kg de leite houve redução de 0,062 ng/ml na concentração de P4, sugerindo que a alta produção de leite poderia influenciar negativamente a taxa de concepção pelo seu efeito na concentração de P4 pós IA.

3.2 Influência da concentração sérica de progesterona pós IA nas taxas de concepção

O reconhecimento e a manutenção da gestação nos bovinos envolvem uma série de sinais transmitidos do embrião para a mãe, que levam à inibição da luteólise (WIELBOLD, 1988; LAMMING et al., 1989; THATCHER et al., 1994; FONSECA et al., 2001; NEVES et al., 2001), permitindo a manutenção do corpo lúteo (CL) e da liberação de P4 e conseqüentemente a manutenção da gestação. (STAPLES e HANSEL, 1961; THATCHER et al., 1994; FONSECA et al., 2001). Perdas embrionárias podem advir de falhas do CL em secretar esse esteróide (STAPLES e HANSEL, 1961; BULMAN e LAMMING, 1978; LUKASZEWSKA e HANSEL, 1980; WIELBOLD, 1988; LAMMING et al., 1989; THATCHER et al., 1994; TEFERA, 2001; BINELLI et al., 2001).

Trabalhos realizados por LUKASZEWSKA e HANSEL (1980); FONSECA et al. (1983); LAMMING et al. (1989); MANN et al. (1995) e FOLMAN et al. (1990), mostraram que as concentrações de P4 pós IA foram maiores em vacas que concebiam. ROBINSON et al. (1989) e MACMILLAN et al. (1991) observaram que implantes vaginais de P4 pós-IA aumentavam a taxa de concepção em vacas, justificando a afirmativa anterior.

VAN CLEEFF et al. (1991) não observaram esta relação em novilhas, sugerindo que a concentração de P4 pós-IA poderia influenciar a taxa de concepção em vacas, mas não em novilhas. HASLER et al. (1980) avaliaram a concentração de P4 em receptoras de embriões bovinos entre os dias 3 e 7, e 9 e 14, e não observaram diferença entre os animais que permaneceram prenhes ou não. Esta diferença também não foi encontrada por ROBINSON et al. (1988), após o uso de PRID no início da gestação. MANN e LAMMING (1995) encontraram concentrações de P4 entre os dias 12 e 16 em torno de 5,7 – 12,3 ng/ml nas vacas vazias e em torno de 4,8 – 10,5 ng/ml em vacas prenhes, afirmando com isso que nem sempre baixas concentrações de P4 acarretam perdas embrionárias, assim como nem sempre altas concentrações de P4 resultam em sucesso na prenhez.

A P4 é importante no controle das mudanças do ambiente uterino, além de influenciar o crescimento embrionário (GEISERT et al. 1992). De acordo com DEMMERS et al. (2001), a concentração materna de P4 é que controla a secreção glandular uterina, estando relacionada com a produção de IFN- τ pelo embrião. GARRET et al. (1988) e KERBLER et al. (1997) demonstraram que o aumento da progesterona pós-IA avançou o desenvolvimento dos embriões, que se apresentaram maiores e com maior secreção de proteínas, indicando maturidade e funcionalidade.

Foi observado por WATHES et al. (1998), que baixa concentração de P4 na fase lútea, poderia resultar em embriões menores no 16º dia do ciclo estral, possivelmente pela menor capacidade de bloquear a luteólise e menor produção de IFN- τ . De acordo com KNICKERBOCKER et al. (1986); GEISERT et al. (1988); MANN et al. (1998) e BINELLI et al. (2001), o aumento da P4 durante a fase lútea e no período crítico estimularia o reconhecimento da gestação.

A secreção de IFN- τ depende do desenvolvimento do embrião, essencial para suprimir a secreção de prostaglandina F2 α (PGF2 α) e manter o CL (THATCHER e HANSEN, 1992; MEYER et al., 1995;

KERBLER et al., 1997). O IFN- τ é secretado pelo concepto no início da gestação, promovendo a supressão dos receptores de ocitocina do epitélio endometrial (WATHES et al., 1998; MANN et al., 1999). De acordo com DEMMERS et al. (2001) esta supressão ocorreu através da inibição da ação dos receptores de estrógeno.

Vacas que geraram embriões com desenvolvimento comprometido apresentaram no lavado uterino concentrações de IFN- τ inferiores, ou até mesmo ausentes, em comparação àquelas fêmeas cujos embriões eram bem desenvolvidos (MANN & LAMMING, 2001).

MANN & LAMMING (1995; 2001) observaram maior concentração de 13,14-dihydro-15-keto PGF $_{2\alpha}$ (PGFM), metabólito da PGF $_{2\alpha}$, quando os níveis de progesterona apresentavam-se menores, concluindo que vacas com menores concentrações plasmáticas de P4 têm maior predisposição à perda embrionária.

A concentração de P4 começa a diminuir por volta do 14^o - 15^o dia do ciclo, ao contrário da PGF $_{2\alpha}$ e da ocitocina, que nesse período começam a se elevar, causando a luteólise (WATHES & LAMMING, 1995). Esse período denominado período crítico, que dura até o 17^o dia do ciclo, é essencial para a manutenção da gestação. A vaca deve

bloquear a luteólise através do conceito, que envia sinais antiluteolíticos, inibindo a produção de PGF2_α pelo endométrio (KNICKERBOCKER et al., 1986; GEISERT et al., 1988; MANN et al., 1998; BINELLI et al., 2001).

Qualquer tratamento que atrase a regressão do CL pode fornecer ao embrião tempo para que ele se desenvolva e inicie a produção dos sinais anti-luteolíticos (THATCHER et al., 1994; MEYER et al., 1995).

A maior taxa de concepção decorrente da maior concentração de P4 pós IA, a importância deste hormônio para o desenvolvimento do embrião e da sua capacidade em inibir a luteólise, mostram que baixa concentração de P4, devido a maior produção de leite e de IMS, pode ser uma das possíveis explicações para o fato de vacas de leite de alta produção apresentarem menor taxa de concepção.

3.3 Efeitos do estresse térmico sobre a taxa de concepção

O estresse térmico é um dos principais fatores que provocam a diminuição na fertilidade em vacas leiteiras durante o verão (HANSEN & ARÉCHIGA, 1999; WOLFENSON et al., 2000; LUCY, 2001).

Vacas leiteiras em lactação são mais sensíveis ao estresse térmico, em função do calor gerado pelo aumento do metabolismo associado à produção de leite, já devido a diminuição da ingestão de matéria seca, ocorre necessidade de aumentar a densidade nutricional da dieta (LUCY, 2001).

O estresse térmico pode comprometer a fertilidade através de alterações no desenvolvimento folicular (WOLFENSON et al., 1995), mudanças nos perfis hormonais e no ambiente uterino, além de morte embrionária precoce (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

Como resposta adaptativa ao estresse térmico, ocorre aumento do fluxo sanguíneo para as áreas periféricas do corpo do animal, buscando maior dissipação da temperatura corporal, comprometendo a função dos órgãos internos, como útero e ovidutos (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999).

O aumento da temperatura no ambiente uterino e ovidutos, decorrente da hipertermia causada pelo estresse térmico, compromete a sobrevivência embrionária, já que exposição à altas temperaturas, reduzem ou até mesmo bloqueiam o desenvolvimento embrionário, levando à redução na síntese de IFN- τ (EDWARDS e HANSEN, 1996, 1997).

O período de maior sensibilidade aos efeitos negativos do estresse térmico começam antes da formação do embrião, já no início do estro e continua até cerca de um dia após a inseminação (PUTNEY et al., 1989; EALY et al., 1993; LUCY, 2001).

A resistência dos embriões aos efeitos negativos do estresse térmico aumenta à medida que ele se desenvolve. Com três dias pós-IA, os embriões aparentemente desenvolveram resistência aos efeitos do estresse térmico (EALY et al., 1993). Segundo EDWARDS & HANSEN (1997) o aumento no número de células embrionárias permite maior sobrevivência do embrião, caso ocorra perda de frações dessas células, e também por estimular o desenvolvimento de mecanismos bioquímicos de termo-proteção.

A concepção diminui significativamente durante o estresse térmico em decorrência da hipertermia e dos ajustes fisiológicos necessários para reduzi-la (WOLFENSON et al., 2000). ULBERG e BURFENING (1967) demonstraram que pequenos aumentos na temperatura corporal das vacas causavam diminuição nas taxas de prenhez. Esse aumento afeta o aparelho reprodutor, comprometendo a capacidade de vacas ficarem prenhes durante o este período. DUNLAP & VINCENT, 1971, observaram que quando a temperatura

corporal aumentou de 38,5° para 40°C durante 72 horas após a inseminação artificial, a taxa de concepção caiu de 48 para 0%.

Ao avaliarem vacas leiteiras em lactação sob estresse térmico, AL-KATANANI et al. (1999) verificaram que as taxas de retorno aos 90 dias foram maiores nos animais com maior produção de leite, sugerindo que há um efeito aditivo do estresse térmico e da produção de leite na diminuição da taxa de concepção.

O estresse térmico é uma das situações em que o atraso no desenvolvimento do concepto se torna mais evidente (THATCHER & HANSEN, 1992), e um embrião subdesenvolvido é menos capaz de bloquear a luteólise (BINELLI et al., 2001).

3.4 Utilização de GnRH ou hCG no dia cinco pós IA visando aumento na secreção de progesterona

Cerca de dois a quatro dias após a emergência da nova onda folicular, o folículo dominante adquire receptores para o hormônio luteinizante (LH), momento em que tem de 8 a 10 mm de diâmetro, sendo então responsivo ao LH e capaz de ovular a este estímulo (XU et al., 1995; GINTHER et al., 1996; SARTORI et al., 2001). Assim, no 5º dia do ciclo estral o folículo dominante é esteroidogenicamente

ativo (BADINGA et al., 1992), capaz de ovular em resposta ao hCG ou GnRH (SCHIMITT et al., 1996a; FONSECA et al., 1999), e induzir a formação de CLa.

O aumento na concentração de P4, em decorrência do uso de agentes gonadotrópicos, eleva a síntese de IFN- τ , favorecendo o estabelecimento e a manutenção da gestação, principalmente naqueles com a função lútea prejudicada (BINELLI et al., 2001; FONSECA et al., 2001). Esses agentes também poderiam apresentar efeito sobre a formação e diferenciação do CL existente, contribuindo para aumentar a concentração de P4 (KERBLER et al., 1997; SANTOS et al., 2001).

O GnRH causou a ovulação do folículo dominante e a formação de um CLa (MORGAN e LEAN, 1993; THATCHER et al., 1993; SCHIMITT et al., 1996a; MANN e LAMMING, 2000; FONSECA et al., 2001;) quando administrado no dia 5 (SCHIMITT et al., 1993, 1996a; FONSECA et al., 2001) ou no dia 7 (MARQUES, 2002). Uma aplicação de GnRH induz a um pico de LH por 5 horas em novilhas (CHENAULT et al., 1990, RAJAMAHENDRAN, et al., 1998), sendo que VASCONCELOS (1998) e RAJAMAHENDRAN, et al. (1998) verificaram taxa de ovulação ao GnRH de 96 e 100% respectivamente, quando aplicado no 5º dia pós IA.

O tratamento com agonista de GnRH aumenta a concentração de LH por 5 horas, sendo que a duração normal da secreção e pico de LH é de cerca de 10 horas (RAHE et al., 1980; CHENAULT et al., 1990). Após o dia 5 do ciclo, a P4 produzida pelo CL em crescimento tem efeito negativo na frequência de pulsos de LH (RAHE et al., 1980; SÁVIO et al., 1993), o que reduziria o suporte gonadotrópico original necessário para o desenvolvimento funcional do CLa após a ovulação do folículo induzido pelo GnRH (SCHIMITT et al., 1996a).

Ao induzir a formação de um CLa durante a fase lútea pela administração de gonadotrofinas pode-se elevar as concentrações plasmáticas de P4 (SCHIMITT et al., 1996), além de diminuir os níveis de estradiol, o que potencialmente atenuaria os mecanismos luteolíticos, criando uma situação mais provável para o estabelecimento da gestação (MANN et al., 1995). HENDERSON e MACNATTY (1975); BOLT et al. (1979); e MACMILLAN et al. (1985), sugeriram que o tratamento com agonista de GnRH poderia prolongar a vida do corpo lúteo e/ou protegê-lo contra a luteólise espontânea.

A administração de Buserelina (análogo do GnRH) no dia 12 pós IA em vacas leiteiras, causou um aumento de 12% nas taxas de

prenhez dos animais tratados em relação ao grupo controle (65,4 vs 53,4%) (DREW e PETERS, 1994). MACMILLAN et al. (1985) ao administrarem Buserelina entre os dias 11 e 13 após a IA, encontraram, quando comparado ao grupo controle, aumento de 11,5% na prenhez ao primeiro serviço (72,4 vs 60,9%) e 15,6% ao segundo serviço (85,1 vs 69,5%).

O hCG, quando aplicado no início do ciclo (entre os dias 4 e 7 após o estro), pode causar a ovulação do folículo dominante e a formação de CLa, podendo aumentar as concentrações de P4 durante o restante da fase luteínica (PRICE e WEBB, 1989; RAJAMAHENDRAN e SIANANGAMA, 1992; SCHMITT et al. 1996; FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001).

A formação e o desenvolvimento do CL são processos dependentes do LH. O hCG possui atividade semelhante a este hormônio, ligando-se a seus receptores nas células lúteas pequenas, sintetizando mais progesterona. Porém a quantidade produzida é maior quando estimuladas pelo hCG do que pelo LH (SANTOS et al., 2001). Segundo HOYER & NISWENDER (1985) ocorre ainda a estimulação do crescimento das células lúteas grandes, principais

produtoras de P4 no CL, dados que não foram confirmados por SCHIMITT et al. (1996a).

A meia-vida mais longa do hCG no sangue (30 horas; CHENAULT et al., 1990) e o menor "turnover" do complexo hCG-receptor de LH na superfície das células da granulosa (NISWENDER et al., 1985 *apud* SCHIMITT et al., 1996a), provavelmente são os responsáveis pelo aumento no estímulo gonadotrópico no folículo ovulatório e sua subsequente diferenciação em CL com maior capacidade de secretar P4 (SCHIMITT et al., 1996a).

O tratamento com hCG no dia 5 pós IA levou a formação de CLa em 86,2% das vacas tratadas, comparados com 23,2% das controle (SANTOS et al., 2001). FONSECA et al. (2001) ao tratar novilhas com GnRH ou hCG no dia 5 pós IA, encontrou a presença de CLa em 41,7% das tratadas com GnRH e em 66,7% das tratadas com hCG.

A concentração de P4 em decorrência da indução de CLa, mostrou-se maior nas novilhas tratadas com hCG do que naquelas tratadas com GnRH no dia 5 (SCHIMITT et al., 1993; 1996; FONSECA et al., 2001), porque o tratamento com hCG produziu um CL maior (RAJAMAHENDRAN e SIANANGAMA, 1992) e mais

pesado, no entanto ambos os tratamentos originaram CL funcionais (SCHIMITT et al., 1996a).

A concentração de P4 (ng/ml) em vacas primíparas foi maior do que nas múltiparas (23,57 vs 14,07), quando tratadas com hCG no dia 5, assim como aumentou também a taxa de prenhez nesses animais (40 vs 30,9%; SANTOS et al., 2001).

É provável que o aumento na concentração deste hormônio promova melhoras nas taxas de concepção, por aumentar as chances de sobrevivência embrionária (SANTOS et al., 2001). LOPEZ-GATIUS et al. (2002), encontraram uma probabilidade 8 vezes menor de perda embrionária naqueles animais com CLa, admitindo uma relação positiva entre a presença do CLa e a manutenção da gestação. SIANANGAMA e RAJAMAHENDRAN (1992), observaram que o uso do hCG elevou as taxas de concepção, quando administrado nos dias 0; 7 ou 14 pós IA, para 47; 62 e 55% respectivamente, comparados com os animais controle, cuja taxa de concepção foi de 40%. SANTOS et al. (2001), comparando vacas tratadas no dia 5 com hCG e vacas controle, encontraram taxas de concepção no dias 28 de 45,8 vs 38,7%, dia 45 de 40,4 vs 36,3% e dia 90 de 38,4% vs 31,9%.

KERBLER et al. (1997) ao tratarem vacas com hCG no dia 5 pós IA obtiveram taxas de prenhez de 75% vs 64% naquelas não tratadas.

4. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é de que o tratamento com GnRH ou hCG no dia cinco pós IA aumenta a concepção em vacas holandesas em lactação durante o verão, devido à ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento e a formação de corpo lúteo acessório com aumento da concentração de progesterona pós IA, potencializando o desenvolvimento do embrião, que produz mais IFN- τ e conseqüentemente há maior inibição da produção de PGF2 α .

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local e período de realização

O experimento foi desenvolvido na Agropecuária Nova América, localizada no município de Assis, SP, durante o período de janeiro a abril.

5.2 Animais

Foram utilizadas 158 vacas em lactação da raça Holandesa, tanto primíparas quanto múltíparas, com produção média de $26 \pm 9,4$ kg de leite/vaca/dia, variando de 6 a 55 kg, com dias pós-parto (DPP) médio de 213 ± 112 dias, variando de 42 a 610 dias, alimentadas com dieta completa a base de silagem de milho, balanceada de acordo com as exigências nutricionais do lote e agrupadas por ordem de lactação, dias em lactação e produção de leite e ordenhadas 3 vezes ao dia.

Os animais não passaram por nenhum protocolo de sincronização e foram inseminados 12 horas após a observação do cio, com sêmen de diferentes touros ($n=8$), todos de fertilidade comprovada e por diferentes inseminadores ($n=3$) com prática na técnica de IA.

No momento da IA, a temperatura retal dos animais foi aferida por termômetro de vidro. Foram realizadas medições diárias da temperatura ambiente, cuja média foi de 26,2°, variando entre a máxima de 39,8° e mínima de 20,0°, assim como também foi medida a umidade relativa do ar, cujo valor médio foi 84%, variando de 56 a 92%, no entanto esses dados não foram utilizados, dando-se preferência à utilização da temperatura retal dos animais, o que de certa forma confere maior individualidade aos dados.

A produção de leite foi avaliada quinzenalmente e os valores são aqueles relativos à média de duas produções do animal, antes e após o tratamento.

5.3 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados no dia 5 pós IA, no período da manhã, considerando o dia do cio como dia zero.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, descritos na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos realizados nas vacas no dia 5 pós IA.

GRUPO	n	TRATAMENTO
Controle	52	Nenhum
GnRH	55	Aplicação de 100mcg IM de Gonadorelina ¹
HCG	51	Aplicação de 2500 UI IM de hCG ²

5.4 Colheita das amostras de sangue

Vinte e dois animais de cada grupo foram separados aleatoriamente para a colheita das amostras de sangue, realizada nos dias 5; 7 e 12, no período da manhã, através de punção da veia coccígea em tubos não heparinizados tipo Vacutainer[®], para dosagem da concentração sérica de P4 (Tab. 2).

Tabela 2. Momentos da colheita das amostras de sangue.

DIA	EXPECTATIVA
5	Anterior ao tratamento. Expectativa de concentrações de P4 semelhantes entre os Grupos tratados e o Controle
7	Expectativa de maior concentração de P4 nos animais tratados com hCG, devido ao efeito luteotrópico.
12	Expectativa de aumento na concentração de P4 nos animais tratados com GnRH e hCG, devido à formação do CLa.

¹ Gonadorelina: Cystorelin[®], Merial; ² hCG: Gonadotrofina coriônica humana, Vetecor[®], Serono Veterinária.

Vacutainer[®]: Becton Dickinson & Company, EUA

As amostras de sangue foram refrigeradas à temperatura de 4°C (geladeira) por 24 horas e depois centrifugadas a 1200g, durante 15 minutos. Após a separação e o devido envase, o soro foi congelado e armazenado a -20°C, até a realização das dosagens.

5.5 Dosagem da progesterona sérica

Foi realizada a técnica de Radioimunoensaio descrita por KNICKERBOCKER et al. (1986) e padronizada no laboratório de radioimunoensaio do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, por PINHEIRO, 1996 e FIGUEIREDO et al., 1997.

O anti-soro específico contra a progesterona bovina foi o mesmo utilizado por KNICKERBOCKER et al. (1986), gentileza da Dra. Magaly Manzo³.

Realizaram-se três ensaios e os coeficientes de variação intraensaio foram de 7,55; 8,15; 5,26 e interensaio de 7,9 e a sensibilidade dos ensaios foi de 0,3 ng/ml.

³ Universidade Central da Venezuela (Maracay, Aragua).

5.6 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado através da palpação retal, entre os dias 42 a 49 após a IA. Foram considerados como indicadores de prenhez positiva a presença de líquido no corno uterino, vesícula palpável e a presença da membrana fetal.

5.7 Análise estatística

Os dados referentes à concentração de P4 foram analisadas mediante o procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System), conforme modelo de medidas repetidas, considerando-se cada animal como parcela principal e cada dia como medida repetida. O modelo incluiu nas parcelas principais os efeitos de grupo, categoria de temperatura retal, categoria de produção de leite e categoria de ordem de lactação, bem como as interações referentes a cada par de fatores; e nas medidas repetidas, o efeito de dia e respectivas interações.

As categorias temperatura retal e produção de leite foram definidas como inferior e superior ou igual aos valores médios observados.

O valor médio da temperatura retal observado foi $39,7 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, e da produção de leite, $26 \pm 9,4$ kg/vaca/dia.

A categoria ordem de lactação foi dividida em primípara e multípara.

Os efeitos de tratamento foram desdobrados nos seguintes contrastes: grupo 1 vs grupo 2; grupo 1 vs grupo 3; grupo 2 vs grupo 3. No caso de interação de grupo com TR estes contrastes foram calculados dentro de cada categoria de TR, e no caso de interação com dia, estes contrastes foram calculados dentro de cada dia.

Os efeitos de dia foram desdobrados nos seguintes contrastes: dia 5 vs dia 7; dia 5 vs dia 12; dia 7 vs dia 12.

Os dados referentes à taxa de concepção foram analisados mediante o procedimento MIXED do SAS, sendo incluídas no modelo estatístico os efeitos de grupo, categoria de temperatura retal, categoria de produção de leite e categoria de ordem de lactação, bem como as interações referentes a cada par de fatores.

As categorias foram definidas conforme modelo anterior.

Os efeitos de tratamento foram desdobrados nos seguintes contrastes: grupo 1 vs grupo 2; grupo 1 vs grupo 3; grupo 2 vs grupo 3. No caso de interação de grupo com TR estes contrastes foram

calculados dentro de cada categoria de TR. As demais categorias, produção de leite e ordem de lactação, não apresentaram interação.

As variáveis “touro” e “inseminador”, por não apresentarem efeito, foram excluídas do modelo.

6 RESULTADOS

6.1 Concentração e aumento percentual da progesterona sérica

Não houve diferença na concentração sérica de P4 (ng/ml) no dia 5 antes do tratamento entre os três grupos, porém no dia 7, verificou-se diferença entre os animais tratados com GnRH e hCG ($P<0,01$). No dia 12, a concentração sérica de P4 foi significativamente maior nos animais que receberam o tratamento com hCG em relação aos que receberam GnRH e destes em relação ao controle ($P<0,01$; Tab. 3).

A concentração sérica de P4 aumentou entre os dias 5 e 7 nos três grupos ($P<0,01$). No grupo controle entre os dias 7 e 12 não houve aumento da P4, que foi significativamente maior ($P<0,01$) nos animais que receberam a aplicação de GnRH ou hCG (Tab. 3).

Tabela 3. Concentração sérica de P4 (ng/ml) nos dias 5; 7 e 12 pós IA de vacas submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média \pm EPM).

DIA/GRUPO	Controle (n=22)	GnRH (n=22)	hCG (n=22)
Dia 5	2,71 \pm 0,43 ^{aA}	2,45 \pm 0,44 ^{aA}	3,23 \pm 0,45 ^{aA}
Dia 7	4,79 \pm 0,43 ^{abB}	4,15 \pm 0,44 ^{aB}	5,75 \pm 0,45 ^{bB}
Dia 12	5,21 \pm 0,43 ^{aB}	6,91 \pm 0,44 ^{bC}	8,53 \pm 0,45 ^{cC}

a,b,c: Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P<0,01$); A,B,C: valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P<0,01$).

O aumento percentual da concentração sérica de P4 foi estimado considerando-se a concentração deste hormônio no dia 5 como 100% e nos dias 7 e 12 como os aumentos percentuais relativos ao dia 5.

No dia 7, a concentração sérica de P4 em relação ao dia 5 aumentou ($P < 0,01$) de maneira proporcional entre os três grupos; controle (77%), GnRH (69%) e hCG (77%) (Fig. 1). No dia 12, P4 aumentou de forma mais expressiva em relação ao dia 7 ($P < 0,01$) nos animais que receberam GnRH (112%) e hCG (87%), enquanto nos animais controle não se observou aumento significativo (16%; $P = 0,31$) na concentração sérica de P4 nesse período em relação ao dia 7 (Fig. 1).

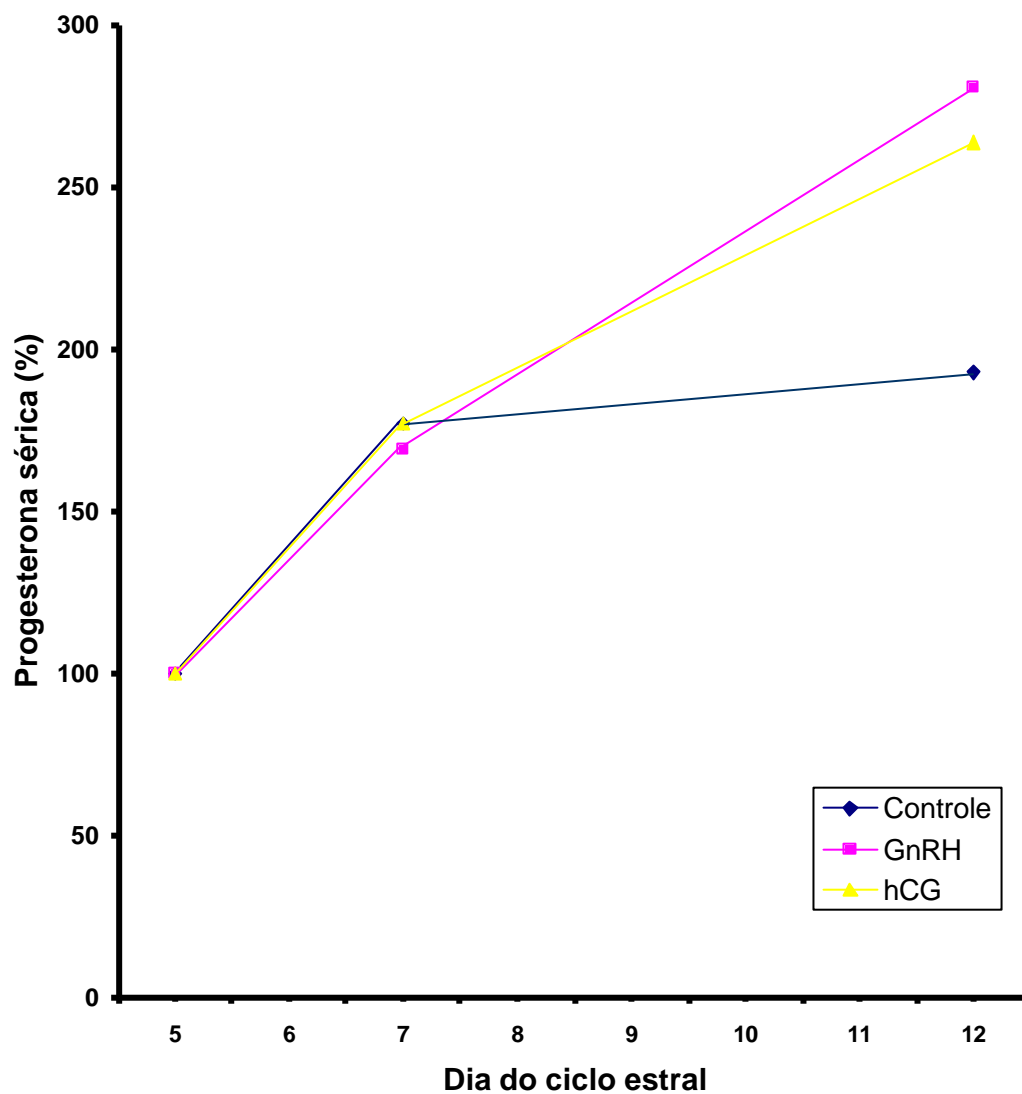


Figura 1. Aumento percentual da concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA nos grupos Controle, GnRH e hCG, considerando a concentração sérica de P4 no dia 5 como 100%.

6.2 Efeito da temperatura retal no momento da IA e dos tratamentos utilizados sobre a concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA

Não houve efeito significativo da temperatura retal no momento da IA sobre a concentração sérica de P4 nos dias 5; 7 e 12 pós IA (Tab. 4 e 5).

Tabela 4. Concentração sérica de P4 em vacas com temperatura retal < 39,7°C, submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média±EPM).

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA			
< 39,7°C			
GRUPO (n)	Controle (26)	GnRH (27)	hCG (21)
DIA 5	3,18±0,55 ^{aA}	2,17±0,59 ^{aA}	3,01±0,67 ^{aA}
DIA 7	5,61±0,55 ^{abB}	3,86±0,59 ^{abB}	5,56±0,67 ^{abB}
DIA 12	6,40±0,55 ^{abB}	6,35±0,59 ^{bcC}	7,87±0,67 ^{bcC}

a,b,c: valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente (P<0,01); A,B,C: valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente (P<0,01).

A concentração sérica de P4 no dia 12, apesar de numericamente semelhante entre os grupos, diferiu estatisticamente (P<0,01) devido às diferenças na proporção de aumento da concentração sérica de P4 entre os dias 7 e 12 nos animais tratados com GnRH e hCG (Fig. 2).

Tabela 5. Concentração sérica de P4 em vacas com temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$, submetidas aos três tratamentos no dia 5 pós IA (média \pm EPM).

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA			
$\geq 39,7^{\circ}\text{C}$			
GRUPO (n)	Controle (26)	GnRH (28)	hCG (30)
DIA 5	2,18 \pm 0,66 ^{aA}	2,72 \pm 0,66 ^{aA}	3,46 \pm 0,59 ^{aA}
DIA 7	3,98 \pm 0,66 ^{abB}	4,44 \pm 0,66 ^{abB}	5,90 \pm 0,59 ^{abB}
DIA 12	4,01 \pm 0,66 ^{abB}	7,47 \pm 0,66 ^{bcC}	9,18 \pm 0,59 ^{bcC}

a,b,c: valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P < 0,01$);
A,B,C: valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P < 0,01$).

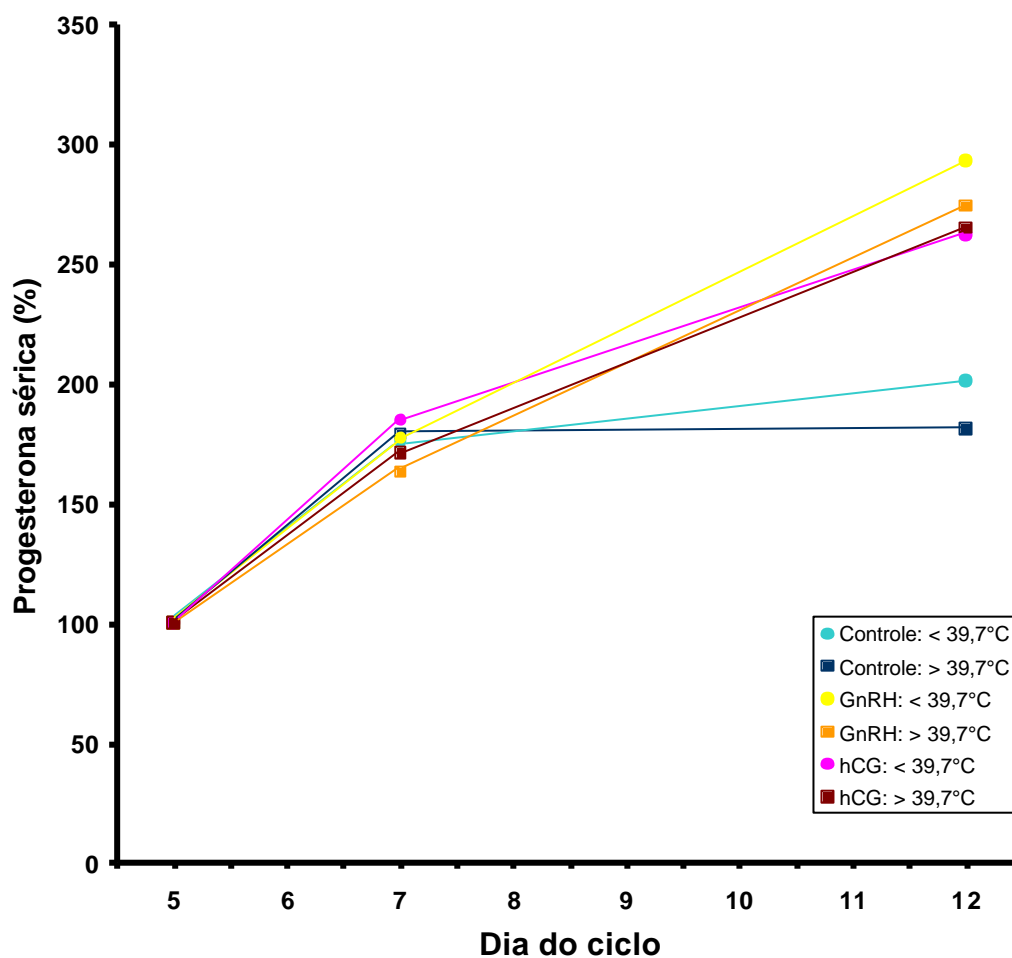


Figura 2. Aumento percentual da concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA em vacas com temperatura retal < ou $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$, nos três grupos, considerando a concentração sérica de P4 no dia 5 como 100%.

6.3 Interação entre a temperatura retal no momento da IA e os tratamentos com GnRH e hCG na taxa de concepção

Houve interação entre os tratamentos utilizados e a temperatura retal no momento da IA ($P < 0,01$) sobre a concepção. Os tratamentos foram eficientes em aumentar as taxas de concepção nos animais com temperatura retal $< 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, mas não influenciaram a concepção de vacas com temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA (Tab. 6).

Tabela 6. Taxas de concepção (%) conforme tratamento realizado no dia 5 pós IA e temperatura retal no momento da IA (média \pm EPM).

GRUPO (n)	TAXA DE CONCEPÇÃO (%)	
	(prenhes/total)	
	$< 39,7^{\circ}\text{C}$	$\geq 39,7^{\circ}\text{C}$
Controle (52)	10,1 \pm 0,07 (3/26) ^A	15,2 \pm 0,08 (4/26) ^A
GnRH (55)	36,8 \pm 0,07 (9/27) ^B	17,8 \pm 0,08 (6/28) ^A
hCG (51)	32,8 \pm 0,09 (7/21) ^B	24,4 \pm 0,07 (7/30) ^A

A,B: valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P < 0,01$).

Nos animais tratados com GnRH ou hCG e com temperatura retal $< 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, houve aumento da concentração sérica de P4 (Fig. 2, Tab. 4 e Tab. 5) e também da concepção (Tab. 6).

Naqueles animais com temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, a concentração sérica de P4 aumentou significativamente ($P < 0,01$) após a aplicação de GnRH ou hCG no dia 5 do ciclo estral (Fig. 2), entretanto a taxa de concepção não aumentou (Tab. 6).

6.4 Produção de leite e ordem de lactação

As variáveis produção de leite e ordem de lactação não influenciaram as concentrações de P4, nem as taxas de concepção nos animais avaliados

7. DISCUSSÃO

7.1 Concentração e aumento percentual da progesterona sérica

Os dados analisados da concentração sérica de P4 são referentes a um subgrupo de animais (n=22 animais/grupo).

Foi observado aumento proporcional na concentração sérica de P4 entre os dias 5 e 7 nos três grupos ($P<0,01$), e que a administração de 100 mcg de GnRH ou 2500 UI de hCG no dia 5 após a IA, aumentou significativamente a concentração deste hormônio ($P<0,01$) entre os dias 7 e 12, enquanto no grupo controle, no dia 12, não foi detectado aumento em relação ao dia 7.

O aumento proporcional da concentração sérica de P4 entre os dias 5 e 7 nos grupos controle e hCG ($P<0,01$), sugere ausência de efeito luteotrópico nos animais tratados com hCG. Esse achado concorda com SCHIMITT et al. (1996a), que ao avaliar a concentração de P4 e a morfologia e funcionalidade do CL original no dia 17, de vacas tratadas com GnRH ou hCG no dia 5 pós IA, observou que não houve aumento da concentração de P4 nem tampouco alterações celulares que justificassem o efeito luteotrópico.

Para que se fundamentasse a hipótese de efeito luteotrópico, seria necessário que fosse detectado a presença de maiores concentrações de P4 no dia 7 nos animais tratados com hCG, sendo que neste estudo não foi observado este efeito, discordando dos resultados de KERBLER et al. (1997), que observaram aumento da P4 em vacas tratadas com 1500 UI de hCG no dia 5 pós IA já a partir do dia 8, mas somente detectaram a presença de CLa entre os dias 10-11, ou seja, a P4 produzida no dia 8 foi originada do CL presente no momento do tratamento, o que caracterizou o efeito luteotrópico.

O tratamento com 3300 UI de hCG (SANTOS et al., 2001) ou com 1500 UI (MARQUES, 2002), causou o aumento do tamanho do CL originado da ovulação espontânea, com conseqüente aumento nas concentrações plasmáticas de P4.

Entre os dias 7 e 12, o aumento da concentração sérica de P4 nos animais tratados ($P < 0,01$) foi justificado pela possível formação de CLa, já que no dia 5 pós IA deve haver um folículo dominante responsivo ao LH (XU et al., 1995; SARTORI et al., 2001) e a administração de hormônios gonadotróficos pode induzir à ovulação deste folículo com subseqüente formação de CLa (SCHIMITT et al., 1996a; DIAZ et al., 1998).

Vários autores relatam o aumento da concentração de P4 pela indução de CLa com os hormônios gonadotrópicos GnRH ou hCG. SCHIMITT, et al. (1996a), aplicou 8µg de Buserelina ou 3000 UI de hCG no dia 5 pós IA em vacas não lactantes, e observaram maior aumento na concentração plasmática de P4 entre os dias 6 e 13 nos animais tratados, atribuindo esse aumento à presença do CLa.

SANTOS et al. (2001), trataram vacas de alta produção com hCG no dia 5 e encontraram, com auxílio da ultra-sonografia e da análise da concentração de P4 entre os dias 11 a 16 pós IA, a formação de CLa em 86,2% das vacas tratadas e aumento de cerca de 5,0 ng/ml na concentração plasmática de P4.

MARQUES (2002), comparou a eficácia da administração em novilhas, no dia 7 do ciclo estral, de 10 µg de Buserelina e 1500 UI de hCG, e os resultados indicaram que os tratamentos foram eficazes na indução do CLa, mas o aumento da concentração P4 entre os dias 13 e 17 ocorreu somente nos animais tratados com hCG.

A maior concentração sérica de P4 no dia 12 nas vacas tratadas com hCG (8,53 ng/ml) em relação às tratadas com GnRH (6,91 ng/ml) confirmaram os estudos realizados por SCHIMITT et al. (1996a), FONSECA et al., (2001) e MARQUES (2002). Essa diferença na

concentração sérica de P4 pode ser atribuída à maior esteroidogenicidade do CL induzido pelo hCG (SCHIMITT et al., 1996b; CHENAULT et al., 1990).

A meia vida mais longa do hCG no sangue (30 horas; CHENAULT et al., 1990) e o turnover mais lento do complexo hCG-receptor de LH na superfície das células da granulosa (NISWENDER et al., 1985 *apud* SCHIMITT et al., 1996a), são os prováveis responsáveis pelo aumento gonadotrópico no folículo ovulatório no dia 5 e sua subsequente diferenciação em CL com maior capacidade de secretar P4 (SCHIMITT et al., 1996a).

Em contraste, o tratamento com agonista de GnRH aumentou a concentração plasmática de LH por somente 5 horas, o que poderia explicar a diferença no potencial dos CL induzidos pelo hCG e GnRH em secretar progesterona (SCHIMITT et al., 1996a).

7.2 Efeito da temperatura retal no momento da IA e dos tratamentos utilizados sobre a concentração sérica de progesterona nos dias 5; 7 e 12 pós IA

Não foi observado efeito significativo da temperatura retal no momento da IA sobre a concentração sérica de P4 nos dias 5; 7 e 12

pós IA, pois esta aumentou independente da temperatura e provavelmente em decorrência do aumento na esteroidogênese causado pela indução do CLa pelo tratamento com GnRH ou hCG ($P < 0,01$).

Achados anteriores da literatura sugerem que altas temperaturas, características de estresse térmico, podem causar diminuição da esteroidogênese das células foliculares (BADINGA et al., 1993), assim como diminuição na concentração da P4 (WOLFENSON et al., 2000), no entanto, os tratamentos aumentaram as concentrações séricas de P4 entre os dias 7 e 12, eliminando o possível efeito negativo do estresse térmico na concentração desse hormônio.

7.3 Interação entre temperatura retal no momento da IA e os tratamentos com GnRH e hCG na taxa de concepção

No presente trabalho, as vacas tratadas com GnRH ou hCG no dia 5 pós IA e com temperatura retal $< 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, apresentaram aumento significativo ($P < 0,01$) na taxa de concepção, já nos animais tratados com temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da

IA, o tratamento com GnRH ou hCG no dia 5 pós IA não apresentou resultados significativos sobre a concepção.

A maior taxa de concepção nos animais tratados pode ser atribuída ao aumento da concentração sérica de P4 entre os dias 7 e 12, em decorrência da formação do CLa, confirmando que o aumento da P4 é importante para o desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação, especialmente durante o período crítico (BINELLI et al., 2001).

Se considerarmos que no dia 14, quando os animais estão entrando no período crítico, momento em que a liberação de P4 pelo CL original tende a diminuir, o CLa induzido pelo tratamento no dia 5 estará com cerca de 9 dias, ou seja, no seu tamanho máximo e produzindo altas concentrações de P4 (NEVES et al., 2001). Nesse período, é essencial a presença de um CL funcional, que garanta concentrações elevadas de P4 para que o embrião se desenvolva adequadamente e consiga produzir os sinais anti-luteolíticos necessários para o bloqueio da luteólise, como o IFN- τ (BINELLI et al., 2001).

Assim, a elevação da concentração sérica de P4 detectado entre os dias 7 e 12 pós IA parece ser o fator determinante para o

estabelecimento da concepção nos animais tratados, pois no momento em que existe risco de luteólise em consequência da diminuição da concentração deste hormônio secretado pelo CL original, o CLa oferece um incremento hormonal, garantindo o reconhecimento e manutenção da gestação. Além do mais, a concentração de P4 elevada aumentaria a síntese de IFN- τ , favorecendo a manutenção da gestação (KERBLER et al., 1997).

SANTOS et al. (2001) encontraram em vacas prenhes com mais de um CL maiores concentrações de P4 no dia 14 e durante toda a fase lútea, relacionando esse aumento à prenhez no primeiro trimestre. Esses dados complementam os de SCHIMITT et al. (1996a) e DIAZ et al. (1998), que observaram aumento da concentração plasmática de P4 entre os dias 6 a 13, em decorrência da presença de CLa, que se manteve elevada durante toda a fase lútea.

A falha dos tratamentos em melhorar a concepção nos animais com temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, se deve, provavelmente, ao comprometimento do embrião na fase inicial do seu desenvolvimento.

Resultados semelhantes foram obtidos por SCHIMITT et al. (1996b) e SANTOS (2001), que pela indução de CLa com o

tratamento com GnRH ou hCG no dia 5 pós IA, não encontraram aumento na concepção durante o verão.

A elevada temperatura retal pode comprometer a concepção por causar morte embrionária precoce (HANSEN & ARÉCHIGA, 1999). O período de maior susceptibilidade à temperatura elevada inicia cerca de 10 horas após o início do estro e vai até cerca de 24 horas após a IA (LUCY 2001). Nesse período ocorre comprometimento do desenvolvimento embrionário (PUTNEY et al., 1988), tornando-se um embrião subdesenvolvido e com menor capacidade de bloquear a luteólise (BINELLI et al., 2001).

O dia da aplicação do tratamento foi posterior a esse momento de maior sensibilidade dos embriões, portanto, possivelmente os embriões já estavam comprometidos, justificando a falta de resposta na concepção, mas não no aumento da concentração sérica de P4.

Altas temperaturas também comprometem o ambiente uterino e os ovidutos (HANSEN e ARÉCHIGA, 1999), prejudicando o desenvolvimento embrionário (EDWARDS e HANSEN, 1996, 1997).

Estes dados mostram que os efeitos deletérios da alta temperatura retal no momento da IA prevaleceram sobre os possíveis benefícios causados pelos tratamentos. Portanto, a concentração de P4

não deve ser considerada como um determinante absoluto para o estabelecimento da prenhez, mas como um fator que influencia na probabilidade de sucesso ou falha (MANN e LAMMING, 1995).

Com base nos resultados, pode-se sugerir como estratégia, a administração de GnRH ou de hCG associado à técnica de transferência de embriões (TE). Como não foi detectado efeito da temperatura retal $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA sobre a concentração sérica de P4, seria interessante utilizar a TE no verão, já que no dia 7 pós IA, dia da inovulação, os embriões já adquiriram resistência aos efeitos negativos da alta temperatura, e a concentração de P4 em decorrência do tratamento vai estar elevada, favorecendo o desenvolvimento do embrião e possivelmente a concepção.

7.4 Produção de leite e ordem de lactação

Não foi observado efeito da produção de leite nem da ordem de lactação sobre a concentração sérica de P4 e taxa de concepção, embora a maior parte da literatura relate que a produção de leite pode influenciar negativamente as concentrações de P4 e a concepção pela alta IMS (NEBEL & MCGILLIARD, 1993; PARR 1993ab; VASCONCELOS et al., 1998).

O efeito da produção de leite e da ordem de lactação sobre a concentração sérica de P4 poderia ter sido detectada no dia 5, anterior ao tratamento. No entanto, não houve diferença na concentração sérica de P4 entre o grupo controle e os grupos tratados nesse momento, que justificasse qualquer influencia da produção de leite ou da ordem de lactação.

O efeito negativo da produção de leite sobre a concentração de P4 e sobre a concepção, foram provavelmente atenuados pelo aumento na concentração de P4 entre os dias 7 e 12, decorrente da indução do CLa pelos tratamentos. O aumento na P4 causado pelos tratamentos parece ter sido suficiente para neutralizar os efeitos negativos da produção de leite sobre a diminuição da concentração sérica de P4, que alcançou valores significativos para a manutenção da prenhez.

Apesar de normalmente vacas primíparas apresentarem maiores concentrações de P4 em relação à múltíparas (VAN CLEEF et al., 1991; SANTOS et al., 2001), no presente trabalho não foi encontrado diferença significativa com relação à concentração de P4, nem com relação à concepção entre essas duas categorias. Essa diferença não foi detectada, provavelmente, em decorrência da maior produção de P4

pelos animais tratados e que apresentaram CLa como também pelo pequeno número de animais avaliados.

Com base nos dados, e em conformidade com a literatura, a indução do CLa causando aumento na concentração sérica de P4 durante a fase lútea, através da aplicação de GnRH ou hCG no dia 5 pós IA, pode ser uma ótima estratégia para favorecer o reconhecimento da prenhez (THATCHER et al., 2001), concordando com a hipótese de LOPEZ-GATIUS et al. (2002), que admitem uma relação positiva entre a presença do CLa e a manutenção da prenhez, sendo que neste estudo, essa relação não ocorreu nos animais com altas temperaturas retais no momento da IA.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após os tratamentos com GnRH e hCG no dia 5 pós IA em vacas da raça holandesa durante o verão nos permitem concluir que:

* a concentração sérica de P4 aumentou durante a fase lútea, independente da temperatura retal que apresentaram no momento da IA;

* a concepção aumentou em vacas com temperatura retal $< 39,7^{\circ}\text{C}$ no momento da IA, mas não aumentou em vacas com temperatura $\geq 39,7^{\circ}\text{C}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AL-KATANANI, Y.M., WEBB, D.W., HANSEN, P.J. Factors affecting seasonal variation in 90-day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **J. Dairy Sci.**, v.82, p.2611-6, 1999.
- BADINGA, L., DRIANCURT, M.A., SAVIO, J.D., WOLFENSON, D., DROST, M., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.46, p.871-83, 1992.
- BADINGA, L., THATCHER, W.W., DIAZ, T., DROST, M., WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.39, p.797-810, 1993.
- BINELLI, M., THATCHER, W. W., MATTOS, R., BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-63, 2001.
- BOLT, D.J. Reduction by human chorionic gonadotropin of the luteolytic effect of prostaglandin PGF₂α. **Prostaglandins**, v.18, p.387-96, 1979.
- BULMAN , D.C., LAMMING, G.E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing a cyclicity in dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p. 447-58, 1978.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicação da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- CAVESTANY, D., EL-WHISHY, A.B., FOOTT, R.H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein Cattle. **J. Dairy Sci.**, v.68, p.1471-8, 1985.
- CHENAULT, J.R. KRATZERT, D.D., RZEPKOWSKI, R.A., GOODWIN, M.C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertilerin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v.34, p.81-6, 1990.
- DEMMERS, K.J., DERECKA, K., FLINT, A. Trofoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v.121, p.41-9, 2001.
- DIAZ, T., SCHIMITT, E.J.P., DE LA SOTA, R.L., THATCHER M.J., THATCHER, W.W., Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrus cycle of heifers. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1929-36, 1998.
- DREW, S.B, PETERS, A.R. Effect of buserelin on pregnancy rates in dairy cows. **Vet. Rec.**, v.134, p.267-9, 1994.
- DUNLAP, S.E., VINCENT, C.K. Influence of post breeding thermal stress on conception rate in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.32, p.1216-8, 1971.
- EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.2899-905, 1993.
- EDUVIE, L.O., SEGUIN, B.E., Corpus luteum function and pregnancy rates in lactating dairy cows given human chorionic gonadotrophin at mid diestrus. **Theriogenology**, v.17, p.415-22, 1982.

- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Elevated temperatures increases Heat Shock Protein 70 synthesis in bovine two cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.340-6, 1996.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and pre-implantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.138-45, 1997.
- FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v.47, p.1489-505, 1997.
- FOLMAN, Y., ROSEMBERG, M., HERZ, Z., DAVIDSON, M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. **J. Reprod. Fertil.**,v.34, p.267-78, 1973.
- FOLMAN, Y., KAIM, M., HERZ, Z., ROSEMBERG, M. Milk yield and fertility of high yielding dairy cows in a sub tropical climate during summer and winter. **J. Dairy Res.**, v.46, p.411-25, 1979.
- FOLMAN, Y., KAIM, M., HERZ, Z., ROSEMBERG, M. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. **J.Dairy Sci.**, v.73, p.2817-25, 1990.
- FONSECA, F.A., BRITT, J.A., McDANIEL, B.T., WILK, J.C., RAKES, A.H. Reproductive traits of Holstein and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrus cycles, detection

- of estrus, conception rate, and days open. **J. Dairy Sci.**, v.66, p.1128-47, 1983.
- FONSECA, J.F., SILVA FILHO, J.M., PINTO NETO, A., PALHARES, M.S., ALVIN, M., T.T., BELISSÁRIO, H., PARDINI, W.S. Efeito da administração de diferentes hormônios sobre a formação de corpo lúteo acessório em novilhas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p. 330-2, 1999.
- FONSECA, J.F., SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., RUAS, J.M.R., PINTO NETO, A. Concentração plasmática de progesterona em novilhas receptoras submetidas à administração de rbST, GnRH, ou hCG no quinto dia do ciclo estral. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 53, n.4, p.451-8, 2001.
- GARRET, J.E., GEISERT, R.D., ZAVYŠ, M.T., MORGAN, G.L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.84, p.437-46, 1988.
- GEISERT, R.D., MORGAN, G.L., SHORT, E.C., ZAVY, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, v 4, p.301-5, 1992.
- GINTHER O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J. R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.
- HASLER, J.F., BOWEN, R.A., NELSON, L.D., SEIDEL, Jr, G.E. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. **J. Reprod. Fertil.**, v.58, p.72-77, 1980.

- HANSEN, P.J., ARÉCHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.36-50, suppl. 2, 1999.
- HENDERSON, K.M., McNATTY, K.P. A biochemical hypothesis to explain the mechanism of luteal regression. **Prostaglandins**, v.18, p.779-97, 1975.
- HOYER, P.B., NISWENDER, G.D. The regulation of steroidogenesis is different in the two types of ovine luteal cells. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 63, p.240-8, 1985.
- KERBLER, T.L., BUHR, M.M., JORDAN, L.T., LESLIE, K.E., WALTON, J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-Tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.703-14, 1997.
- KNICKERBOCKER, J.J., THATCHER, W.W., BAZER, F.W., DROST, M., BARRON, D.H., FINCHER, K.B., ROBERTS, L.M. Proteins secreted by day -16 to -18 bovine conceptuses extend corpus luteum function in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 77, p. 381-91, 1986.
- LAMMING, G.E., DARWASH, A.O., BACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **J. Reprod. Fertil.**, v. 37,suppl., p. 245-52, 1989.
- LEWIS, G.S., CALDWELL, D.W., DOWLEN, H. H., OWEN, J.R., REXROAD JR, C.E. Effects of gonadotrophin-releasing hormone and human chorionic gonadotrophin on pregnancy rate in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.66-72, 1990.

- LOPEZ-GATIUS, F., SANTOLARIA, P., YÁNIS, J., RUTLLANT, J., LÓPEZ-BÉJAR, M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38-90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, v.57, p.1251-61, 2002.
- LUCY, M.C. Estratégias de manejo de vacas leiteiras para melhoria dos índices reprodutivos durante o verão. In: V CURSO: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2001, Uberlândia. **Anais...Uberlândia-MG**, 2001. p.12-8.
- LUKASZEWSKA, J., HANSEL, W. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v. 59, p. 485-93, 1980.
- MACMILLAN, K.L., DAY, A.M., TAUFAN, V.K., PETERSON, A.J., PEARCE, M.G. Effects of an agonist of GnRH. II. Interaction with injected PGF₂ α and unilateral ovariectomy. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 8, p. 213-23, 1985.
- MACMILLAN, K.L., THATCHER, W.W. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 883-9, 1991.
- MANN, G.E., LAMMING, G.E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.104, p.1-5, 1995.
- MANN, G.E., LAMMING, G.E., FRAY, M.D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. **Anim. Reprod. Sci.**, v.37, p.121-31, 1995.

- MANN, G.E., LAMMING, G.E., FISHER, P.A. Progesterone control of interferon- τ production during early pregnancy in the cow. **J. Reprod. Fertil., Abst. Series**, v.21, p.37, 1998.
- MANN, G.E., LAMMING, G.E., ROBINSON, R.S., WATHES, D.C. The regulation of interferon- τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, suppl., p.317-28, 1999.
- MANN, G.E., LAMMING, G.E. Effect of continuous infusion of a GnRH agonist (BuserelinTM) on ovarian hormone secretion and estrous cycle length in cows. **Theriogenology**, v. 54, p.219-27, 2000.
- MANN, G.E., PAYNE, J.H., LAMMING, G.E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F₂ α secretion by the bovine and ovine uterus *in vivo*. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.21, p.127-41, 2001.
- MANN, G.E., LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, 175-80, 2001.
- MARQUES, M.O. **Ultra-sonografia ovariana, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embriões submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral.** São Paulo, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

- McDERMOTT, J.M., THATCHER, W.W., DROST, M., MARTIN, J.M., PUTNEY, D.J. Effect of hCG on cycle length, response to PGF_{2α} and pregnancy rate in dairy cattle. **J. Anim. Sci.**, v.63, suppl., p.354, 1986. (abstract)
- MEYER, M.D., HANSEN, P.J., THATCHER, W.W., DROST, M., BADINGA, L., ROBERTS, R.M., LI, J., OTT, T.L., BAZER, F.W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine prostaglandin F_{2α} of cows in response to recombinant interferon-τ. **J.Dairy Sci.**, v.78, p.1921-1931, 1995.
- MORGAN, W.F., LEAN, I.J. Gonadotrophin-releasing hormone treatment in cattle: a meta analysis of the effects on conception at the time of the insemination. **Aust. Vet. J.**, v. 70, p. 205-9, 1993.
- MORRIS, L.M., GONZALEZ-PADILLA, E., NISWENDER, G.D., WILTBANK, J.N. Peripheral progesterone levels in pregnant and non-pregnant heifers following use of hCG. **Theriogenology**, v.6, p. 367-78, 1976.
- NAKAO, T., NARITA, S., TANAKA, K., SHIRAKAWA, J., NOSHIRO, H., SAGA, N., TSUNODA, N., KAWATA, K. Improvement of first service pregnancy rate in cows with gonadotrophin-releasing hormone analogue. **Theriogenology**, v.20, p.111-9, 1983.
- NEBEL, R.L., MCGILLIARD, M.L. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows, **J. Dairy Sci.**, v.76, p.3257-68, 1993.
- NEVES, J.P., OLIVEIRA, J.F.C.O., MACIEL, M.N. Diagnóstico de gestação em bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO,

- J.R., FREITAS, V.J.F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2001. p.1-13.
- PARR, R.A., DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.306-10, 1993a.
- PARR, R.A. DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Res. Vet. Sci.**, v.55, p.311-6, 1993b.
- PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., DO VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.
- PRICE, C.A., WEBB, R. Ovarian responses to hCG treatment during the estrus cycle in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.303-8, 1989.
- PUTNEY D.J., DROST, M., THATCHER, W.W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, p.195-209, 1988.
- PUTNEY, D.J., MULLINS, S., THATCHER, W.W., DROST, M., GROSS, T.S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.19, p.37-51, 1989.

- RAHE, C.H., OWENS, R.E., NEWTON, H.J., FLEEGER, J.L., HARMS, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v.107, p.498-503, 1980.
- RAJAMAHENDRAN, R., SIANAGAMA, P.C. Effect of human chorionic on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. **J. Reprod. Fertil.**, v.95, p.577-84, 1992.
- RAJAMAHENDRAN, R., AMBROSE, J.D., SCHIMITT, E.J.P., THATCHER, M.J., THATCHER, W.W. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v.50, p.1141-55, 1998.
- ROBINSON, N.A., LESLIE, K.E., WALTON, J.S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.202-7, 1989.
- SANTOS, J.E.P., THATCHER, W.W., POOL, L., OVERTON, M.W. Effect of human chorionic gonadotrophin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.2881-94, 2001.
- SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C.P., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of

ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1403-09, 2001.

SAVIO, J.D., THATCHER, W.W., MORRIS, G.R., ENTWISTLE, K., DROST, M., MATTIACI, M.R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.77-84, 1993.

SCHIMITT, E.J.P., DIAZ, T., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Diferencial responses of the luteal phase in cattle following ovulation of the first wave follicle with a GnRH agonist versus hCG. **J. Anim. Sci.**, v. 71, suppl., p.212, 1993. (abstract)

SCHIMITT, E.J.P., BARROS, C.M., FIELDS, M.J., DIAZ, T.T., KLUGE, J.M., THATCHER, W.W. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotrophin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotrophin on day five of the estrus cycle. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p.1915-29, 1996a.

SCHIMITT E.J.P., DIAZ, T., BARROS, C.M., DE LA SOTA, R.L., DROST, M., FREDRIKSSON, E.W., SRAPLES, C.R., THORNER, R., THATCHER, W.W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first wave dominant follicle with human chorionic gonadotropin versus gonadotropin releasing hormone agonist. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1074-83, 1996b.

- SIANANGAMA, P.C., RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotrophin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy rates in cows. **Theriogenology**, v. 38, p.85-96, 1992.
- SIANANGAMA, P.C., RAJAMAHENDRAN, R. Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on the follicular dynamics and cycle length in cows. **Theriogenology**, v. 45, p. 583-92, 1996.
- STAPLES, R.E., HANSEL, W.W. Luteal function and embryo survival in the bovine. **J. Dairy Sci.**, v.44, p.2040, 1961.
- TEFERA, M., CHAFFAUX, S., THIBIER, M., HUMBLLOT, P. A short note: lack of effect of post-AI hCG or GnRH treatment on embryonic mortality in dairy cattle. **Liv. Prod. Sci.**, v. 1, p.277-81, 2001.
- THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. Systems to alter embryo survival. In: VAN HORN, H.H., WILCOX, C.J. (Eds). **Large dairy herd management**. Champaign: Management Services American Dairy Science Association, 1992. p.16-30.
- THATCHER, W.W., DROST, M., SAVIO, J.D., MACMILLAM, K.L., ENTWISTLE, K.W., SCHMITT, E.J., DE LA SOTA, R.L., MORRIS, G.R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 33, p. 27-49, 1993.
- THATCHER, W.W., STAPLES, C. R., DANET-DESNOYERS, G., OLDICK, B., SCHMITT, E.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **J. Anim. Sci.**, v.72, suppl. 3, p.16-30, 1994.

- THATCHER, W.W., MOREIRA, F., SANTOS, J.E.P., MATTOS, R.C., LOPES, F.L., PANCARI, S.M., RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-89, 2001.
- ULBERG, L.C., BURFENIG, P.J. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. **J. Anim. Sci.**, v.26, p.571-7, 1967.
- VAN CLEEFF, J., DROST, M., THATCHER, W.W. Effects of post-insemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrus responses of dairy heifers. **Theriogenology**, v.36, p.795-807, 1991.
- VASCONCELOS, J.L.M. **Avaliação da sincronização de ovulação e de fatores relacionados com a produção de leite e taxa de concepção em vacas**. Jaboticabal, 1998. 116 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- VASCONCELOS, J.L.M., SILCOX, R.W., ROSA, G.J.M., PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p.1067-78, 1999.
- WATHES, D.C., ROBINSON, R.S., MANN, G.E., LAMMING, G.E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 33, p.279-84, 1998.

- WIELBOLD, J.L. Embryonic mortality and uterine environment in first-service lactating dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 84, p.393-9, 1988.
- WILTBANK, J.N., ROTH LISBERGER, J.A., ZIMMERMAN, D.R. Effect of human chorionic gonadotrophin on maintenance of the corpus luteum and embryo survival in the cow. **J. Anim. Sci.**, v. 20, p.827-9, 1961.
- WOLFENSON, D., THATCHER, W.W., BADINGA, L., SAVIO, J.D., MEIDAN, R., LEW, B.J. Effect of heat-stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biol. Reprod.**, v.52, p.1106-13, 1995.
- WOLFENSON, D., ROTH, Z., MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 535-47, 2000.
- XU, Z., GAVERNICK, H.A., SMITH, G.W, HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-7, 1995.