



**TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO**

**APLICAÇÃO DE AGONISTAS DE GnRH NO  
MOMENTO DA TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
VACAS HOLANDESAS**

**LAVRAS – MG  
2013**

**TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO**

**APLICAÇÃO DE AGONISTAS DE GnRH NO MOMENTO DA  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
VACAS HOLANDESAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

Co-orientadores

Dr. José Nélio de Sousa Sales

Dra. Nadja Gomes Alves

**LAVRAS – MG  
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Pinto, Tássia Louregiani Carvalho.

Aplicação de agonistas de GnRH no momento da transferência de embriões produzidos *in vitro* em vacas holandesas / Tássia Louregiani Carvalho Pinto. – Lavras : UFLA, 2013.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Bovinos. 2. Taxas de gestação. 3. Progesterona. 4. Hormônios sintéticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08926

**TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO**

**APLICAÇÃO DE AGONISTAS DE GnRH NO MOMENTO DA  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* EM  
VACAS HOLANDESAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de Julho de 2013.

Dr. Eduardo Pinto Filgueiras  
Dr. Gustavo Augusto de Andrade  
Dra. Lourenya Tatiana Flora Chalfun

UFLA  
IFSUL DE MINAS/MACHADO

Dr. José Camisão de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2013**

*Aos meus pais, Aparecida e Henrique, que sempre estão ao meu lado me dando  
força, amor e apoio.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por tudo que sempre fez por mim, pela força e perseverança que sempre dá.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado com todo amor incondicional e apoio. A eles que devo tudo que sou e que muito me ensinaram e continuam me ensinando. Agradeço por estarem ao meu lado nos momentos felizes, compartilhando alegrias comigo, e nos momentos difíceis me ajudando a superá-los.

Aos meus irmãos pelo afeto e amizade.

A minha vó Ivone pelo carinho e pelas orações.

Ao Zezé pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação e orientação. Pelo grande profissional e mentor que é.

A toda minha família e amigos pelo suporte e afeto.

A todas as pessoas que me ajudaram na execução do trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos a mim concedida e ao programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias.

*“Tem mais samba no encontro que na espera  
Tem mais samba a maldade que a ferida  
Tem mais samba no porto que na vela  
Tem mais samba o perdão que a despedida  
Tem mais samba nas mãos do que nos olhos  
Tem mais samba no chão do que na lua  
Tem mais samba no homem que trabalha  
Tem mais samba no som que vem da rua  
Tem mais samba no peito de quem chora  
Tem mais samba no pranto de quem vê  
Que o bom samba não tem lugar nem hora  
O coração de fora  
Samba sem querer*

*Vem que passa  
Teu sofrer  
Se todo mundo sambasse  
Seria tão fácil viver”*

*(Chico Buarque – Tem Mais Samba)*

## RESUMO

Alta produção de leite pode prejudicar a eficiência reprodutiva em vacas Holandesas pela diminuição da progesterona circulante. A transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro*, além do tratamento com agonistas de GnRH podem melhorar as taxas de gestação em vacas Holandesas em lactação. Foi hipotetizado que a administração intramuscular (i. m.) de agonistas de GnRH em vacas Holandesas no dia da TE com embriões produzidos *in vitro* aumenta o número de corpos lúteos acessórios, a concentração de progesterona e a taxa de gestação. Dias em lactação médio foram  $190,4 \pm 133$  dias. Escore de condição corporal médio foi de  $3,37 \pm 0,45$ . As receptoras (n = 254) foram alocadas para um de três tratamentos i.m. no dia da TE: Controle – 2,5 ml de salina; Buserelina – 10 µg de acetato de Buserelina; Deslorelina – 750 µg de acetato de Deslorelina. Ultrassonografia e amostras de sangue foram feitas no dia e sete depois do tratamento. O primeiro diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 - 40 dias e o segundo aos 60 - 80 dias pós TE. Porcentagens de vacas gestantes e com CL acessório foram analisadas pelo procedimento GENMOD (SAS<sup>®</sup>) como distribuição binomial. As concentrações de progesterona foram analisadas como medidas repetidas no tempo pelo modelo misto do procedimento MIXED (SAS<sup>®</sup>). A proporção de vacas com CL acessório foi maior para a Buserelina comparada ao controle (P = 0,0045) e Deslorelina (P < 0,0001). As concentrações totais de progesterona não foram influenciadas (P = 0,84) pelos tratamentos. A taxa de gestação final não foi diferente (P = 0,32) entre os tratamentos. Em conclusão, os agonistas de GnRH não melhoraram as taxas de gestação, nas condições do presente experimento.

Palavras-chave: Bovinos. Taxa de gestação. Progesterona. Hormônios sintéticos.

## ABSTRACT

High milk production may impair reproduction efficiency in Holstein cows by lowering circulating progesterone. The transfer of *in vitro* derived embryos in addition to GnRH agonist treatment may improve pregnancy rates in lactating Holstein cows. It was hypothesized that the intramuscular (i.m.) injection of GnRH agonists in lactating Holstein cows on the day of *in vitro* derived embryo transfer (ET) increases the number of accessory corpora lutea, progesterone concentrations and pregnancy rates compared to untreated controls. Average days in lactation were  $190.4 \pm 133$  d and body condition score was  $3.37 \pm 0.45$ . Recipients ( $n = 254$ ) were allocated to one of three i.m. treatments on the day of ET: Control – 2.5 ml saline; Buserelin – 10  $\mu$ g Buserelin acetate; Deslorelin – 750  $\mu$ g Deslorelin acetate. Ultrasonography and blood samples were done on the day of and seven days after treatment. The first pregnancy diagnosis was performed between 30 - 40 days and the second between 60 - 80 days post ET. Percentages of pregnancy and cows with accessory CLs were analyzed as binomial distributions by the GENMOD procedure (SAS<sup>®</sup>). Progesterone concentrations were analyzed as time repeated measures by the MIXED procedure (SAS<sup>®</sup>). The proportion of cows with accessory CLs was greater in the Buserelin treatment compared to control ( $P = 0.0045$ ) and Deslorelin ( $P < 0.0001$ ). Total progesterone concentration was not influenced ( $P = 0.84$ ) by treatments. The final pregnancy rate was not different ( $P = 0.32$ ) between treatments. In conclusion, GnRH agonists did not improve pregnancy rates, under the present experimental conditions.

Keywords: Bovine. Pregnancy rate. Progesterone. Synthetic hormones.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Sequência de aminoácidos do GnRH endógeno.....	14
Figura 2 Sequência de aminoácidos da Buserelina .....	14
Figura 3 Sequência de aminoácidos da Deslorelina .....	15

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Proporção de vacas com presença de corpos lúteos acessórios uma semana após o uso ou não de agonistas de GnRH ..... 44

Tabela 2 Concentrações de progesterona em vacas da raça Holandesa no dia da transferência do embrião e sete dias depois. Números são médias dos quadrados mínimos (LSM)  $\pm$  erro padrão da média..... 45

Tabela 3 Proporção de vacas gestantes ao primeiro diagnóstico de gestação (30 - 40 dias) em relação ao uso ou não de agonistas de GnRH ..... 46

Tabela 4 Proporção de vacas gestantes no segundo diagnóstico de gestação (60 - 80 dias) em relação ao uso ou não de agonistas de GnRH ..... 46

## SUMÁRIO

### **PRIMEIRA PARTE**

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH).....	14
2.2 Controle sobre o Hormônio Luteinizante na reprodução .....	15
2.3 Formação de corpo lúteo acessório .....	19
2.4 Progesterona e Gestação .....	21
REFERÊNCIAS .....	26

### **SEGUNDA PARTE – ARTIGO: Aplicação de Agonistas de GnRH no Momento da Transferência de Embriões Produzidos *In Vitro* em Vacas**

Holandesas .....	31
Conteúdo .....	32
Introdução .....	33
Material e Métodos .....	36
Resultados .....	42
Discussão .....	47
Conclusão .....	54
Referências .....	55

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Em rebanhos bovinos especializados em produção de leite é essencial que os animais estejam sempre saudáveis, principalmente para assegurar a sua reprodução. Historicamente, produtores conscientes se preocupam em manter seus rebanhos nas melhores condições possíveis para que sejam efetivamente produtivos, buscando sempre alternativas para maximizar o desempenho reprodutivo.

Várias são as biotecnologias, em uma propriedade, que podem ser usadas na reprodução de vacas, dentre elas: inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), protocolos de sincronização da ovulação, tratamentos com hormônios sintéticos para aumentar taxas de prenhez e reduzir perdas embrionárias, e, em muitos casos, essas alternativas podem estar conciliadas.

A aplicação de hormônios sintéticos, como agonistas do GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), para melhorar taxas de gestação de IA e TE tem sido estudada. No entanto, existem ainda, poucos estudos tratando desse tema em relação a embriões originados de cultivo *in vitro*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar os possíveis efeitos do uso de agonistas do GnRH no momento da TE na melhora da taxa de gestação e concentração de progesterona de vacas Holandesas.

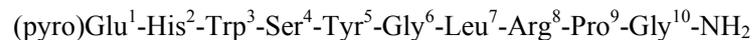
Hipotetizou-se que a administração de agonistas de GnRH (Buserelina e Deslorelina) em vacas Holandesas, no dia da transferência do embrião, aumenta o número de corpos lúteos acessórios, a concentração de progesterona e a taxa de gestação em comparação a animais não tratados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)

O Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) é produzido no hipotálamo e atua na hipófise sobre a síntese e secreção de LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante), que são os principais hormônios gonadotróficos, que por sua vez, em fêmeas, atuam no controle da fisiologia ovariana.

O GnRH é um hormônio proteico decapeptídeo (JEONG; KAISER, 2006), cuja sequência de aminoácidos (MATSUO et al., 1971) é mostrada na Figura 1:



**Figura 1.** Sequência de aminoácidos do GnRH endógeno

Atualmente, existem diversos tipos de agonistas de GnRH, tais como, a Buserelina e a Deslorelina.

A Buserelina é um agonista do GnRH que possui 9 peptídeos em sua sequência (Figura 2), sendo a diferença do GnRH endógeno a D-Serina na posição 6 e a remoção da Glicina na posição 10 e adição de etilamida (KERTSCHER et al., 1995).



**Figura 2.** Sequência de aminoácidos da Buserelina

A Deslorelina também é um agonista do GnRH, e assim como a Buserelina, é um nonapeptídeo (Figura 3). A diferença do GnRH endógeno é a substituição da Glicina na posição 6 por D-Triptofano e a remoção da Glicina na posição 10 e adição de etilamida a Prolina (SILVESTRE, 2003).

(pyro)Glu<sup>1</sup>-His<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-**D-Trp<sup>6</sup>**-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-**NHetilamida**

**Figura 3.** Sequência de aminoácidos da Deslorelina

## 2.2 Controle sobre o Hormônio Luteinizante na reprodução

O Hormônio Luteinizante (LH) é uma gonadotrofina produzida na hipófise e liberada pela ação do GnRH neste órgão. Este hormônio atua no ovário e é responsável pela luteinização do folículo, formando então, o corpo lúteo (CL). Quimicamente, as gonadotrofinas são classificadas como glicoproteínas (CHILDS, 2006).

Alguns estudos têm sido feitos para verificar se a administração de GnRH sintético aumenta a concentração, o pico e o surto de LH, para então aumentar a progesterona (P4) circulante. Sendo assim, COLAZO et al. (2009a) fizeram, em vacas com ovários intactos, repetidas aplicações de GnRH (100 µg de Gonadorelina) baseando-se na presença de CL 7 - 8 dias após o estro. As vacas foram tratadas duas vezes, com intervalo de 12 h, com PGF2α e selecionadas para receberem GnRH 36 h (controle), 36 e 38 h (GnRH 38), 36 e 40 h (GnRH 40) após a primeira dose de PGF2α. O período entre duas e quatro horas depois da aplicação do primeiro GnRH coincide com os tempos estimados para ocorrência do pico de LH e retorno das concentrações de LH para concentrações próximas às basais, respectivamente. As vacas do GnRH 38 apresentaram concentração média de LH maior que do controle e GnRH 40. Em

resposta ao segundo tratamento de GnRH, o pico de LH foi maior no GnRH 38 do que no GnRH 40. Apesar desses resultados, as concentrações de P4 foram maiores no grupo controle do que nos demais, ou seja, o objetivo final não foi atingido. Em um segundo experimento, os autores testaram diferentes doses de GnRH (50, 100 e 250 µg) em vacas ovariectomizadas que estavam com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR). Os tratamentos foram realizados 36 h após a remoção do CIDR. Não houve diferença entre os tratamentos na concentração média de LH no pico e no intervalo do tratamento ao pico (h). Porém, as vacas que receberam 250 µg apresentaram maior liberação de LH pela hipófise, tendo maior concentração de LH no plasma que as vacas que receberam 50 µg ou 100 µg, e ainda, as vacas do grupo 250 µg tiveram maior duração do surto de LH que as vacas de 50 µg. Fica claro então, que o efeito do GnRH pode ser dose dependente, de acordo com a circunstância.

É importante salientar que vários estudos abordam o uso de GnRH na tentativa de melhorar os índices de prenhez aplicando-o após a cobrição. A administração de agonista de GnRH (Buserelina), em vacas, 12 dias após a cobrição por touros, promoveu pico nas concentrações séricas de LH 2 - 3 h após a injeção e diminuiu nas 2 horas subsequentes. E, para as vacas que receberam salina, não foram observadas diferenças nas concentrações no mesmo período (5 horas) de amostragem (YILDIZ et al., 2009). Resultados similares foram encontrados em relação ao pico de LH, com a mesma droga e mesma dose (10,5 µg), porém, o tratamento foi realizado sete dias após a IA em novilhas (KAYGUSUZOGLU et al., 2010). Nesses casos, pode-se concluir que a dinâmica farmacológica das concentrações de LH em resposta a aplicação de GnRH em momentos distintos pós-cobrição foi semelhante.

O GnRH também é utilizado com o objetivo de controlar a ovulação. Esse uso pode acarretar possíveis consequências da aplicação sobre a dinâmica e as características físicas do folículo pré-ovulatório. A ovulação prematura

induzida por GnRH (100 µg de Gonadorelina) administrado 12 h antes da IA afetou o diâmetro do folículo ovulatório, resultando em menor diâmetro e conseqüentemente menor concentração de P4 (MUSSARD et al., 2007). Dentro de parâmetros de normalidade fisiológica é possível inferir que quanto maior o folículo, maior o número de células da granulosa e, por conseguinte, maior o potencial esteroidogênico do futuro corpo lúteo (PFEIFER et al., 2012). Adicionalmente, vacas tratadas com GnRH, com pulso de LH próximo da ovulação, têm maiores concentrações de P4 comparadas às vacas tratadas, porém sem pulso. Ainda, o tempo de administração do GnRH influencia o pulso de LH e conseqüentemente as concentrações de P4, sendo que vacas tratadas entre 10 e 11 h após o início do estro apresentam maiores concentrações de P4 do que os animais tratados entre 14 e 15 h (FIELDS et al., 2009).

O intervalo de tempo do início do estro até o pico (concentração mais alta dentro do surto) do surto de LH diminui com o uso de GnRH (Gonadorelina e Buserelina) aplicado durante os primeiros sinais de estro em comparação a vacas que não recebem tratamento algum. Por outro lado, o tratamento não foi capaz de alterar o intervalo de tempo do pico do surto de LH até a ovulação (KAIM et al., 2003).

Outra forma de produzir efeito similar a aplicação de GnRH é o uso conjunto do próprio LH, objetivando não apenas a sincronização da ovulação, mas também a possível correção de problemas na função ovariana, tais como cistos e anestro. Nesse sentido, e atentando para o fato de ser comum sincronizar vacas com o protocolo Ovsynch (com duas aplicações de GnRH intercaladas de 9 dias e uma de PGF2 $\alpha$  no dia 7), COLAZO et al. (2009b) testaram, além do protocolo com duas doses de GnRH (grupo 1), GnRH no dia 0 e LH suíno (LHs) no dia 9 (grupo 2), LHs no dia 0 e GnRH no dia 9 (grupo 3) e LHs nos dias 0 e 9 (grupo 4). Em todos os grupos a IA foi realizada 14 - 18 h depois da segunda dose de GnRH ou LHs. Com isso, os autores relataram que a taxa de gestação

foi maior no grupo 2 do que nos outros grupos. De 366 vacas do estudo, 45 foram consideradas não cíclicas e dessas, 21 apresentavam cisto folicular ovariano. As vacas não cíclicas tiveram maior resposta ovulatória em relação à primeira dose de LHs ou GnRH do que as vacas cíclicas. De maneira geral a resposta ovulatória foi maior nos animais que receberam LHs no dia 0 do que nos animais que receberam GnRH no dia 0. Estes achados indicam a dupla função de uma gonadotrofina e de seu hormônio liberador como elementos de sincronização da ovulação e de correção de disfunção ovariana.

Deve-se ter cautela com administrações repetidas de GnRH, pois a aplicação, por exemplo, 5 e 15 dias após a inseminação pode aumentar o intervalo de estro e aumentar o risco de não gestação. Esse efeito prejudicial da aplicação repetida de GnRH (dias 5 e 15) parece resultar da diminuição dos receptores de LH, já que esses receptores são, geralmente, expressos nas pequenas células luteais. A estimulação excessiva desses receptores, resultante das aplicações repetidas de GnRH, faz com que as pequenas células luteais se transformem mais rapidamente em grandes células luteais, não seguindo o curso fisiológico do desenvolvimento do corpo lúteo e sendo assim, o LH pode perder, em parte, seu efeito luteotrófico (ALILA; HANSEL, 1984; BARTOLOME et al., 2005; FITZ et al., 1982).

Existem diferenças entre as ações dos agonistas de GnRH, tanto relacionados com a molécula dos mesmos, quanto em relação às dosagens utilizadas. Em um estudo com vacas Holandesas (RAJAMAHENDRAN et al., 1998), implantes de Deslorelina nas doses de 700 e 2100 µg provocaram maior liberação de LH, em um período de 0 - 12 h de tratamento, do que injeção de Buserelina (8 µg, i.m.). E ainda, o implante de 700 µg induziu maior liberação que o de 2100 µg. As concentrações plasmáticas de LH nos três grupos aumentaram dentro de uma hora, atingiram valores máximos dentro de 3 horas e mantiveram-se altas por até 5 - 6 h. Após esse período, as concentrações

começaram a declinar até os patamares basais novamente. O grupo Deslorelina 700 teve maiores concentrações basais de LH entre 12 - 48 h comparado ao grupo 2100 e Buserelina. A maior liberação de LH pelos implantes do que pela Buserelina pode ser devida às altas doses de Deslorelina. O motivo pelo qual Deslorelina 700 teve maior liberação aguda e maiores concentrações basais de LH pode ser pela dessensibilização dos gonadotrofos em resposta à dose mais alta (2100 µg).

Com o intuito de melhorar a sincronia das ovulações e consequentemente aumentar as taxas de gestação, o GnRH foi usado no protocolo de sincronização da ovulação no dia da IA. O objetivo foi atingido, pois a taxa de gestação foi maior quando se administrou GnRH. Essa melhora na sincronização da ovulação pode ter sido provocada pela indução de um surto de LH pré-ovulatório mais constante e pela estimulação da ovulação nas vacas que, por algum motivo, poderia ter sido adiada (SÁ FILHO et al., 2010).

É importante saber que, dependendo do agonista de GnRH utilizado, da dose e do tempo de utilização, as alterações referentes ao LH e concentrações de P4 podem ser variáveis. Não obstante, o emprego de agonistas de GnRH e LH deve ser considerado como vantajoso para a fertilidade, de acordo com a maioria dos relatos documentados na literatura.

### **2.3 Formação de corpo lúteo acessório**

Em vacas reprodutivamente normais, geralmente, após a ovulação, ocorre a formação de apenas um corpo lúteo (CL). No entanto, artifícios para formação de corpos lúteos acessórios estão sendo usados com o objetivo de aumentar as concentrações de P4 (BECH-SABAT et al., 2009). Sendo assim, Howard et al. (2006) observaram que em vacas tratadas com 100 µg de GnRH (Gonadorelina) no 5<sup>o</sup> dia após a IA ocorreu a formação de CL acessório no 13<sup>o</sup>

dia. De modo semelhante, em estudo realizado com vacas sob efeito de estresse térmico, foi verificado que animais tratados com 100 µg de GnRH (Gonadorelina) no dia 5 pós IA apresentaram aumento no número de CLs entre os dias 5 e 17 pós IA, e no 17<sup>o</sup> dia o número de CLs presentes foi maior nas vacas que receberam GnRH no dia 5 do que nas vacas que receberam o GnRH 11 dias depois da IA ou que não foram tratadas (WILLARD et al., 2003).

Além do GnRH, a Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) também pode ser utilizada com intuito de induzir formação de CL acessório em vacas de leite (BELTRAN; VASCONCELOS, 2008). Segundo Stevenson et al. (2007), existe relação linear e positiva entre o número de folículos  $\geq 5$  mm no momento do tratamento (entre 4 e 9 dias pós IA) com GnRH ou hCG e o número de CLs induzidos, sendo que os animais com 1 ou 2 folículos  $\geq 5$  mm tiveram menos CLs induzidos do que os que apresentavam 4 ou mais folículos desse mesmo tamanho. Em vacas de corte o efeito do hCG é similar ao efeito em vacas de leite, sendo este hormônio capaz de induzir a ovulação quando usado 7 dias após a IATF. Com isso, foi observado que o número de CLs acessórios foi maior com o hCG quando comparado ao uso de salina (grupo controle). Em adição, no dia 33, a proporção de vacas prenhes que apresentavam CLs acessórios foi maior no grupo hCG que no controle (DAHLEN et al., 2010). Ainda, o GnRH ou o hCG podem ser utilizados após a confirmação da gestação, sendo que ambos hormônios são capazes de formar nova estrutura luteal (STEVENSON et al., 2008). A administração de hCG aos 29 dias pós IA ampliou o número de CLs acessórios no estudo de Bartolome et al. (2012).

De maneira geral, pode ser observado que a indução da formação de corpo lúteo acessório ocorre com sucesso quando se administra hormônios luteotróficos ao longo do ciclo estral, criando mais opções que podem ser adicionadas a protocolos reprodutivos.

## 2.4 Progesterona e Gestação

A progesterona é um hormônio esteroide produzido pelo corpo lúteo (STOUFFER, 2006), sendo responsável pela manutenção da gestação, principalmente nos seus dois terços iniciais, em bovinos (SHELDON et al., 2002). Na gestação, a P4 exerce influência sobre o desenvolvimento do embrião, produção de interferon-*tau* e inibição da cascata luteolítica (SHAHNEH et al., 2008).

Concentrações subótimas de P4 podem prejudicar a gestação e provocar perda embrionária. Estudos têm sido realizados para tentar resolver esse problema, porém, há ainda muita inconsistência sobre a utilização de hormônios luteotróficos para aumentar a P4 endógena com o objetivo de melhorar a fertilidade (HOWARD et al., 2006).

Garcia-Ispuerto et al. (2006) observaram em seu estudo que vacas com corpo lúteo adicional têm 0,32 vezes menos chance de perder a gestação do que vacas com somente um corpo lúteo. Esse resultado sugere que, provavelmente, vacas com concentrações subótimas de P4 durante o período fetal precoce podem ter o desenvolvimento do concepto comprometido.

Além de depender da secreção, as concentrações de P4 dependem, também, da taxa de *clearance* da circulação (SILVESTRE, 2003). Vacas de leite de alta produção têm alto consumo de alimento, com isso o fluxo sanguíneo no fígado é aumentado, podendo esse fator causar aumento no metabolismo de esteroides (SANGSRITAVONG et al., 2002). Alguns autores presumem que a perda fetal precoce de vacas de alta produção leiteira possa estar relacionada ao alto catabolismo da progesterona devido à alta ingestão de alimentos, à função luteal deficiente, ou ambos, levando então, a concentrações de progesterona abaixo do esperado para manter a gestação (BECH-SABAT et al., 2009).

Ataman et al. (2011) avaliaram o uso de GnRH (injeção de 20 µg de Buserelina) 12 dias após a IA e seu efeito na concentração de P4 no plasma e taxa de gestação em vacas de leite. Vacas prenhes que receberam o GnRH tiveram suas concentrações maiores nos dias 18 e 21 que as vacas prenhes que receberam salina. Apesar desses valores encontrados em relação às concentrações nos dias 18 e 21 terem sido importantes e significativos, as taxas de gestação entre os dias 21 e 45 não foram diferentes. Em outro estudo (PAKSOY; KALKAN, 2010), conduzido em fazenda de gado de leite, cinco grupos de animais foram formados, administrando-se 10 µg de Buserelina (GnRH) no dia da IA e 12 dias após, ou GnRH no dia da IA e hCG 12 dias após, ou hCG em ambos os dias, ou hCG primeiro e depois GnRH, ou salina em ambos os dias, sendo identificados como grupos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos para taxas de gestação. Entre as fêmeas gestantes em cada grupo houve diferença na concentração de P4 no soro sanguíneo somente no dia 5 para o quarto grupo, sendo menor nesse grupo que nos demais, e entre as não gestantes, as concentrações desse hormônio não foram diferentes em quaisquer dias. Então, os tratamentos não foram capazes de influenciar as taxas de gestação e concentrações de P4. Em contraste com este estudo, Lopez-Gatius et al. (2006) mostraram que a administração de GnRH (100 µg de Gonadorelina) no dia da IA e 12 dias após foi efetiva em aumentar a taxa de gestação de vacas de leite de alta produção durante a estação quente do ano. Por outro lado, o uso de uma única dose de GnRH (Gonadorelina) 12 dias após a IA não melhorou o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (SZENCI et al., 2006). Esses resultados são coerentes com os de Franco et al. (2006) que relataram que a administração de GnRH nos dias 11-15 após a ovulação esperada ou inseminação não aumentou a fertilidade de vacas e novilhas de leite.

Vasconcelos et al. (2011) compararam a taxa de gestação e a concentração de P4 no soro sanguíneo empregando diferentes tipos de

protocolos para indução de ovulação, buscando definir qual o mais adequado em relação à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Os protocolos foram: GnRH (100 µg de Gonadorelina) + P4, PGF2α, estradiol, IATF ou TETF; e Estradiol + P4, PGF2α, estradiol, IATF ou TETF. Esses autores relataram que as taxas de gestação aos 28 e 60 dias com TETF foram maiores que as taxas com IATF, independentemente do protocolo, entretanto, não houve diferença entre os protocolos. Sete dias após o início do protocolo, as concentrações de P4 no soro sanguíneo foram maiores no grupo do GnRH do que do estradiol. Essa concentração maior para GnRH era de se esperar, pois, aparentemente, vacas que ovulam em resposta ao GnRH tendem a formar CL acessório, que culmina, geralmente, com aumento da P4 circulante. No entanto, 17 dias após o início do protocolo não houve efeito de tratamento na P4. Uma das vantagens da transferência de embriões é o uso de somente embriões viáveis. Nota-se que a TE tem sido cada vez mais utilizada, sejam os embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*. A TE tem-se mostrado importante, principalmente por diminuir os danos causados nos primeiros dias de fertilização/gestação. Os efeitos de qualidade de oócitos, de desenvolvimento inicial do embrião e de estresse calórico afetando a fertilidade têm sido reduzidos por essa biotecnologia.

A administração de GnRH (100 µg de Gonadorelina) 5 dias após a IA aumentou a concentração de P4 no soro sanguíneo no 13º dia pós IA, e apesar desse resultado, as taxas de gestação não foram diferentes entre o grupo GnRH e o controle (HOWARD et al., 2006). Corroborando esse estudo, Beltran e Vasconcelos (2008) observaram que as concentrações séricas de P4 aumentaram do 7º para o 12º dia com injeção de GnRH (100 µg de Gonadorelina) aplicada no dia 5 pós IA, em relação aos animais não tratados. Ainda, a aplicação do mesmo agonista do GnRH no 5º ou 11º dia após a inseminação aumentou as concentrações de P4 no soro sanguíneo a partir de quatro dias após a injeção,

que persistiu até o 19<sup>o</sup> após a IA. O motivo da administração de GnRH nos dias 5 e 11 após a inseminação é que, no primeiro caso, ocorre indução da ovulação do folículo dominante da primeira onda, assim há formação de CL acessório e este CL ajudaria a aumentar a P4 no início do ciclo. E no segundo caso, além de causar aumento da produção de P4, esse tempo coincide com o período crítico do reconhecimento materno da gestação que se dá 3 - 4 dias após, e então tende a evitar o início dos efeitos luteolíticos, que acabam prejudicando o embrião, podendo haver sua perda. Mas, esses efeitos do GnRH ainda precisam ser melhor elucidados, pois apesar do aumento das concentrações de P4, não houve diferença na taxa de gestação entre vacas tratadas com GnRH no dia 5 ou 11 pós IA, em relação ao controle (WILLARD et al., 2003). Além disso, o tratamento com GnRH 11 dias após a ovulação esperada não alterou as concentrações plasmáticas de P4 no dia 15 em novilhas inseminadas durante o período de estresse calórico e também não influenciou a taxa de gestação (FRANCO et al., 2006).

Alguns rebanhos de alta produção leiteira têm alta incidência de perda fetal precoce. Na tentativa de diminuir essas perdas, foi realizado um estudo (BECH-SABAT et al., 2009) com dois tratamentos: administração de progesterona (PRID); ou GnRH no primeiro diagnóstico de gestação (28 - 34 dias após a IA). Com isso, foi observado que a concentração de P4 no plasma, sete dias após o tratamento, aumentou com PRID em comparação ao GnRH e grupo controle (animais não tratados). Ainda, as fêmeas com gestação de apenas um bezerro com um único corpo lúteo, tratadas com PRID, tiveram a probabilidade de perda fetal precoce diminuída em relação às fêmeas que receberam GnRH. Em contrapartida, os animais com dois ou mais CLs que foram tratados com PRID tiveram três vezes mais chance de perda de gestação em comparação aos que receberam GnRH. E, apesar da produção de P4 direta do CL não ter sido avaliada, o uso de dispositivo intravaginal de liberação de P4

(PRID) por 28 dias no dia do primeiro diagnóstico de gestação (28 - 34 dias) foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de P4 nos primeiros sete dias após o tratamento, comparado ao grupo que recebeu GnRH ou que não recebeu tratamento algum. Esses resultados indicam que o excesso de progesterona foi associado a perdas fetais quando mais de um CL estava presente.

É fato observar que existem vários estudos sobre a utilização de diversos hormônios, inclusive agonistas de GnRH, com o objetivo de promover alteração de características luteais, aumento subsequente nas concentrações de P4 e melhora nas taxas de gestação. Porém, como foi visto, ainda não há coerência quanto ao tempo específico de administração das drogas e possivelmente, também, pode haver diferença na potência dessas drogas. Adicionalmente, é relevante observar que a maioria dos estudos com hormônios sintéticos usados com tais objetivos, refere-se à IA ou IATF, sendo raros os estudos com transferências de embriões. Até o momento da redação dessa revisão não havia estudos relacionando o tema com a utilização de embriões produzidos *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ALILA, H.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1015-1025, 1984.
- ATAMAN, M. B. et al. The effect of buserelin injection 12 days after insemination on selected reproductive characteristics in cows. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 80, n. 2, p. 171-177, June 2011.
- BARTOLOME, J. A. et al. Effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, Woburn, v. 78, n. 5, p. 1110-1116, Sept. 2012.
- \_\_\_\_\_. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 4, p. 1026-1037, Mar. 2005.
- BECH-SABAT, G. et al. Pregnancy patterns during the early fetal period in high producing dairy cows treated with GnRH or progesterone. **Theriogenology**, Woburn, v. 71, n. 6, p. 920-929, Apr. 2009.
- BELTRAN, M. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 580-586, jun. 2008.
- CHILDS, G. V. Gonadotropes and lactotropes. In: JIMMY, D. N. et al. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Louis: Academic, 2006. p. 1483-1494.
- COLAZO, M. G. et al. Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. **Theriogenology**, Woburn, v. 71, n. 6, p. 984-992, Apr. 2009a.
- \_\_\_\_\_. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. **Theriogenology**, Woburn, v. 72, n. 2, p. 262-270, July 2009b.

DAHLEN, C. R. et al. Administration of human chorionic gonadotropin 7 days after fixed-time artificial insemination of suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2337-2345, July 2010.

FIELDS, S. D. et al. Effects of GnRH treatment on initiation of pulses of LH, LH release, and subsequent concentrations of progesterone. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 37, n. 4, p. 189-195, Nov. 2009.

FITZ, T. et al. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 27, n. 3, p. 703-711, 1982.

FRANCO, M. et al. Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. **Theriogenology**, Woburn, v. 66, n. 4, p. 945-954, Sept. 2006.

GARCIA-ISPIERTO, I. et al. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, Woburn, v. 65, n. 4, p. 799-807, Mar. 2006.

HOWARD, J. M. et al. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 95, n. 3/4, p. 224-233, Oct. 2006.

JEONG, K. H.; KAISER, U. B. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: JIMMY, D. N. et al. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Louis: Academic, 2006. p. 1635-1701.

KAIM, M. et al. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 2012-2021, June 2003.

KAYGUSUZOGLU, E. et al. Effect of GnRH administered 7 days after insemination on serum progesterone, luteinizing hormone and duration estrous cycle with pregnancy rates in heifers. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 9, n. 9, p. 1400-1405, 2010.

KERTSCHER, U. et al. Pathways of degradation of buserelin by rat kidney membrane. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 273, n. 2, p. 709-715, 1995.

LOPEZ-GATIUS, F. et al. The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. **Theriogenology**, Woburn, v. 65, n. 4, p. 820-830, Mar. 2006.

MATSUO, H. et al. Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone: I., the proposed amino acid sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 43, n. 6, p. 1334-1339, 1971.

MUSSARD, M. L. et al. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 937-943, Apr. 2007.

PAKSOY, Z.; KALKAN, C. The effects of GnRH and hCG used during and after artificial insemination on blood serum progesterone levels and pregnancy rate in cows. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, Kars, v. 16, n. 3, p. 371-375, 2010.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, MG, v. 41, n. 4, p. 1004-1008, Apr. 2012.

RAJAMAHENDRAN, R. et al. 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**, Woburn, v. 50, n. 7, p. 1141-1155, Nov. 1998.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, Woburn, v. 73, n. 5, p. 651-658, Mar. 2010.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, Nov. 2002.

SHAHNEH, A. Z. et al. The effect of GnRH injection on plasma progesterone concentrations, conception rate and ovulation rate in iranian holstein cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 7, n. 9, p. 1137-1141, Sept. 2008.

SHELDON, I. M. et al. Effect of the regressing corpus luteum of pregnancy on ovarian folliculogenesis after parturition in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 66, n. 2, p. 266-271, Feb. 2002.

SILVESTRE, F. T. **Reproductive, ovarian and uterine responses to a GnRH-agonist (Deslorelin) implant during and after the postpartum summer heat-stress period in dairy cattle**. 2003. 178 f. Dissertation (Master in Animal Science) - University of Florida, Gainesville, 2003.

STEVENSON, J. S. et al. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 331-340, Jan. 2007.

\_\_\_\_\_. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 8, p. 3092-3101, Aug. 2008.

STOUFFER, R. L. Structure, function, and regulation of the corpus luteum. In: JIMMY, D. N. et al. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Louis: Academic, 2006. p. 475-526.

SZENCI, O. et al. Evaluation of GnRH treatment 12 days after AI in the reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, Woburn, v. 66, n. 8, p. 1811-1815, Nov. 2006.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Woburn, v. 75, n. 6, p. 1153-1160, Apr. 2011.

WILLARD, S. et al. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. **Theriogenology**, Woburn, v. 59, n. 8, p. 1799-1810, Apr. 2003.

YILDIZ, H. et al. Effect of post-mating GnRH treatment on serum progesterone, luteinizing hormone levels, duration of estrous cycle and pregnancy rates in cows. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 29, n. 3, p. 110-114, 2009.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**Aplicação de Agonistas de GnRH no Momento da Transferência de  
Embriões Produzidos *In Vitro* em Vacas Holandesas**

Artigo formatado segundo as normas da Revista *Reproduction in  
Domestic Animals*

## **Aplicação de Agonistas de GnRH no Momento da Transferência de Embriões Produzidos *In Vitro* em Vacas Holandesas**

### **Conteúdo**

Alta produção de leite pode prejudicar a eficiência reprodutiva em vacas Holandesas pela diminuição da progesterona circulante. A transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro*, além do tratamento com agonistas de GnRH podem melhorar as taxas de gestação em vacas Holandesas em lactação. Foi hipotetizado que a administração intramuscular (i. m.) de agonistas de GnRH em vacas Holandesas no dia da TE com embriões produzidos *in vitro* aumenta o número de corpos lúteos acessórios, a concentração de progesterona e a taxa de gestação. Dias em lactação médio foram  $190,4 \pm 133$  dias. Escore de condição corporal médio foi de  $3,37 \pm 0,45$ . As receptoras ( $n = 254$ ) foram alocadas para um de três tratamentos i.m. no dia da TE: Controle – 2,5 ml de salina; Buserelina – 10  $\mu\text{g}$  de acetato de Buserelina; Deslorelina – 750  $\mu\text{g}$  de acetato de Deslorelina. Ultrassonografia e amostras de sangue foram feitas no dia e sete depois do tratamento. O primeiro diagnóstico de gestação foi

realizado aos 30 - 40 dias e o segundo aos 60 - 80 dias pós TE. Porcentagens de vacas gestantes e com CL acessório foram analisadas pelo procedimento GENMOD (SAS<sup>®</sup>) como distribuição binomial. As concentrações de progesterona foram analisadas como medidas repetidas no tempo pelo modelo misto do procedimento MIXED (SAS<sup>®</sup>). A proporção de vacas com CL acessório foi maior para a Buserelina comparada ao controle ( $P = 0,0045$ ) e Deslorelina ( $P < 0,0001$ ). As concentrações totais de progesterona não foram influenciadas ( $P = 0,84$ ) pelos tratamentos. A taxa de gestação final não foi diferente ( $P = 0,32$ ) entre os tratamentos. Em conclusão, os agonistas de GnRH não melhoraram as taxas de gestação, nas condições do presente experimento.

Palavras-chave: Bovinos. Taxa de gestação. Progesterona. Hormônios sintéticos.

### **Introdução**

É sempre importante que os animais de um rebanho leiteiro estejam saudáveis, principalmente para assegurar bons resultados na

reprodução. Na gestação a P4 exerce influência sobre o desenvolvimento do embrião, produção de interferon-*tau* e inibição da cascata luteolítica (Shahneh et al., 2008). Concentrações subótimas de P4 podem prejudicar a gestação e provocar perda embrionária. Vacas de leite de alta produção têm alto consumo de alimento, com isso o fluxo sanguíneo no fígado é aumentado, podendo esse fator causar aumento no metabolismo de esteroides, diminuindo, por consequência, as concentrações de P4 na circulação, levando, então, a provável queda na fertilidade desses animais (Sangsritavong et al., 2002).

A indução de corpo lúteo acessório tem sido realizada com o objetivo de elevar a P4 circulante (Bech-Sabat et al., 2009). Garcia-Ispierto et al. (2006) observaram em seu estudo que vacas com corpo lúteo adicional têm 0,32 vezes menos chance de perder a gestação do que vacas com somente um corpo lúteo. Vacas que receberam GnRH no dia da IA e 12 dias após, tiveram 3,7 vezes mais chance de apresentar CL acessório do que vacas que não receberam dose alguma (Lopez-Gatius et al. 2006).

A aplicação de GnRH 5 dias após o estro para indução de CL novo promoveu elevação da concentração de P4 (Schmitt et al. 1996).

Beltran e Vasconcelos (2008) observaram que as concentrações séricas de P4 aumentaram do 7<sup>o</sup> para o 12<sup>o</sup> dia com injeção de GnRH aplicada no dia 5 pós IA, em relação aos animais não tratados. A administração de GnRH 5 dias após a IA aumentou a concentração de P4 no soro sanguíneo no 13<sup>o</sup> dia pós IA, e apesar desse resultado, as taxas de gestação não foram diferentes entre o grupo GnRH e o controle (Howard et al., 2006).

Adicionalmente, é relevante observar que a maioria dos estudos com hormônios sintéticos usados com o objetivo de promover alteração de características luteais, aumento subsequente nas concentrações de P4 e melhora nas taxas de gestação, refere-se à IA ou IATF, sendo raros os estudos com transferências de embriões. O objetivo desse estudo foi verificar os possíveis efeitos do uso de agonistas do GnRH no momento da TE na melhora da taxa de gestação de vacas Holandesas.

## **Material e Métodos**

### ***Local e Época do ano***

O experimento foi conduzido entre os meses de agosto e outubro de 2011, totalizando 42 dias, na Fazenda São João, localizada no município de Inhaúma – MG, de latitude -19° 29' 28'' e longitude -44° 23' 23''.

### ***Animais e Tratamentos***

Duzentos e cinquenta e quatro animais foram utilizados, sendo que animais que repetiram estro ao longo do estudo foram reutilizados, totalizando 285 eventos (n = 285). Foram utilizadas vacas em lactação da raça Holandesa, ordenhadas duas vezes ao dia, mantidas em *free-stall* e alimentadas com ração completa total formulada para atender ou exceder as exigências do NRC para vacas de leite em lactação (National Research Council, 2001). O valor médio para dias em lactação (DEL) dos animais foi  $190,4 \pm 133$  dias. Para análise de DEL foram criadas duas classes:

DEL1  $\leq$  130 dias e DEL2  $>$  130 dias. O escore de condição corporal (ECC) médio foi de  $3,37 \pm 0,45$  (escala de 1 a 5). Foram criadas duas classes de ECC para análise: ECC1  $\leq 3,25$  e ECC2  $> 3,25$ . O número de lactações médio foi de  $2,04 \pm 0,08$ . Duas classes de número de lactação foram criadas para avaliar o efeito de paridade e de sua interação com tratamento sobre a taxa de gestação: primíparas e multíparas. A produção média de leite aos quatorze dias foi de  $26,75 \pm 0,52$  Kg. As vacas foram alocadas aleatoriamente para um de três tratamentos no dia da transferência do embrião. No caso de repetição de cio, após haverem sido implantadas anteriormente, era mantida a aleatoriedade, o que, eventualmente colocou vacas em tratamentos diferentes ou não, dos quais esses animais haviam participado. Os animais receberam um de três tratamentos por via intramuscular (i.m.), sendo eles: 1) Controle – injeção de 2,5 ml de solução salina; 2) Buserelina – injeção de 10  $\mu$ g de acetato de Buserelina (Sincroforte®, Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil); 3) Deslorelina – injeção de 750  $\mu$ g de acetato de Deslorelina (Sincrorrelin®, Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil). Os tratamentos foram administrados a grupos de vacas distintos, semanalmente, ao longo de 42 dias. As

receptoras apresentavam estro natural, o qual era observado duas vezes por dia (manhã e tarde).

### ***Embriões***

Os embriões foram produzidos no Laboratório Querença Embriões a partir de doadoras da raça Holandesa da própria fazenda São João. Foi utilizada a técnica de aspiração folicular ou *ovum pick-up* (OPU) para recuperação de ovócitos. Os embriões foram produzidos *in vitro* a partir da fertilização com sêmen de vários touros de fertilidade semelhante. A transferência do embrião foi realizada pelo método não cirúrgico.

### ***Avaliação ultrassonográfica dos ovários***

A avaliação dos ovários foi realizada via endorretal com o ultrassom Aloka SSD 500 (Berger, São Paulo, SP, Brasil) equipado com transdutor linear de 5,0 MHz. O primeiro exame ultrassonográfico foi realizado imediatamente antes da transferência do embrião, e sete dias após, foi feito o segundo exame. Animais detectados com presença de

corpo lúteo receberam, no momento da colocação do embrião, um dos três tratamentos já mencionados previamente. Dados de folículos, corpo lúteo e corpo lúteo acessório foram mapeados manualmente em relatórios de campo, de acordo com localização na imagem do ultrassom. A formação de corpo lúteo acessório foi considerada quando na primeira avaliação existia corpo lúteo e na segunda avaliação houve formação de nova estrutura luteínica no local onde havia folículo anteriormente.

Para a determinação do efeito dos tratamentos sobre a formação de corpos lúteos acessórios foram contabilizados 146 eventos.

#### ***Coleta de sangue para determinação da progesterona (P4)***

Imediatamente antes da primeira avaliação dos ovários e sete dias após a aplicação do tratamento, 10 ml de sangue foram coletados via artéria/veia coccígea em tubos vacutainer heparinizados, para determinação de P4. As amostras de sangue foram mantidas resfriadas até serem centrifugadas (1000 x g, 20 min). O plasma foi separado, armazenado em tubos identificados esterilizados (3810X standard<sup>®</sup>, Eppendorf, Alemanha) mantidos a -20°C até o ensaio para determinação

de P4. As concentrações de P4 foram determinadas por radioimunoensaio (RIA). O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi de 2,03%.

O total de 65 vacas foi utilizado para as dosagens de progesterona (P4), sendo então, 130 amostras (duas amostras para cada animal). O número de amostras analisadas em cada tratamento foi: Controle (n = 23), Buserelina (n = 21); e Deslorelina (n = 21).

### ***Diagnóstico de gestação e perda embrionária***

A ultrassonografia transretal foi realizada por técnico experiente aos 30 - 40 dias para diagnóstico de gestação inicial e aos 60 - 80 dias para confirmação da gestação.

Para o diagnóstico final de gestação, 267 eventos foram considerados, pois 18 vacas foram diagnosticadas prenhes no diagnóstico inicial, porém, não foram examinadas novamente, não confirmando, então, a gestação no diagnóstico final. Quarenta e três vacas não tiveram o diagnóstico inicial e no segundo diagnóstico estavam vazias, então foram consideradas somente para efeito do tratamento sobre o diagnóstico

final de gestação. Para o diagnóstico inicial, somente, foram analisados 242 eventos, pois 43 eventos não tiveram esse diagnóstico.

Para análise de perda embrionária foram computados somente 55 eventos, pois nem todas as vacas, como já reportado previamente, tiveram diagnósticos inicial e final.

### *Análises Estatísticas*

Todas as análises foram realizadas pelos procedimentos do Statistical Analysis System (SAS, 2002).

Os dados relativos às proporções de vacas gestantes, de perdas embrionárias e de presença de CLs acessórios foram tratados como modelos generalizados no procedimento GENMOD, considerando-se a distribuição binomial. As proporções foram comparadas por contrastes ortogonais, considerando-se o valor de 5% como diferença estatística.

As concentrações de progesterona foram submetidas à análise de variância utilizando o procedimento Mixed. O modelo incluiu os efeitos de tratamento, de dia e da interação tratamento versus dia. O termo de erro foi vaca dentro de tratamento. O número e diâmetro dos corpos

lúteos acessórios foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM. As médias foram comparadas pelo teste SNK. O valor de 5% determinou diferença estatística.

## **Resultados**

A proporção de vacas gestantes no diagnóstico final não foi influenciada ( $p = 0,08$ ) pela classe de DEL (20,7 vs 12,3%, para DEL1 e DEL2, respectivamente). O escore corporal não influenciou as taxas de gestação inicial e final e não houve interação com tratamento. As proporções de vacas gestantes ao diagnóstico final de gestação foram 16,13% (25/155) e 16,07% (18/112) para as classes ECC1 e ECC2, respectivamente. O diagnóstico final de gestação não foi influenciado pela classe de paridade e não houve efeito da interação com o tratamento. As proporções de vacas gestantes no diagnóstico final de gestação foram de 15,25% (18/118) e 16,78% (25/149) para as classes de paridade de primíparas e multíparas, respectivamente.

A quantidade de CLs acessórios ( $p = 0,70$ ) não foi influenciada pelos tratamentos. Os números médios de CLs acessórios foram  $1,16 \pm$

0,13;  $1,21 \pm 0,09$  e  $1,00 \pm 0,23$ , nos tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Não houve efeito ( $p = 0,98$ ) do tratamento sobre o diâmetro do CL acessório. O diâmetro do CL acessório, independentemente dos tratamentos, teve correlação positiva ( $r^2 = 0,37$ ;  $p = 0,05$ ) com a concentração de progesterona.

A concentração de progesterona não foi influenciada pela presença de CL acessório, não havendo efeito interativo com o tratamento. No entanto, a aplicação de Buserelina aumentou a proporção de vacas com presença de CL acessório, em comparação ao grupo controle ( $p = 0,0045$ ) e ao grupo da Deslorelina ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, a Deslorelina teve efeito negativo ( $p = 0,04$ ), diminuindo a proporção de vacas com CL acessório em comparação ao controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Proporção de vacas com presença de corpos lúteos acessórios uma semana após o uso ou não de agonistas de GnRH

Tratamento	CL Acessório		Total
	Ausente	Presente	
Controle <sup>b</sup>	76,47% (39/51)	23,53% (12/51)	51
Buserelina <sup>a</sup>	48,94% (23/47)	51,06% (24/47)	47
Deslorelina <sup>c</sup>	91,67% (44/48)	8,33% (4/48)	48
Total	72,60% (106/146)	27,40% (40/146)	146

$p < 0,0001$

Letras diferentes nas colunas indicam as seguintes diferenças: Contraste 1- Controle vs Buserelina ( $p = 0,0045$ ); Contraste 2- Buserelina vs Deslorelina ( $p < 0,0001$ ); Contraste 3- Controle vs Deslorelina ( $p = 0,04$ ).

Contrastes foram gerados no procedimento de modelos generalizados (GENMOD).

Tanto a Buserelina quanto a Deslorelina não foram efetivas em aumentar as concentrações de P4 em relação ao grupo controle, sete dias após os tratamentos. Porém, em relação ao dia de administração houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ), sendo que para os três grupos a média de concentração de P4 foi maior sete dias após a transferência do embrião (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentrações de progesterona em vacas da raça Holandesa no dia da transferência do embrião e sete dias depois. Números são médias dos quadrados mínimos (LSM)  $\pm$  erro padrão da média

Trat <sup>1</sup>	Progesterona (ng/mL)		Probabilidade		
	Dia*		Trat	Dia	Trat*Dia
	7	14			
Con (n = 23)	2,56 $\pm$ 0,42	5,68 $\pm$ 0,43	0,84	0,0001	0,17
Bus (n = 21)	2,39 $\pm$ 0,45	5,91 $\pm$ 0,46			
Desl (n = 21)	2,58 $\pm$ 0,45	5,10 $\pm$ 0,46			
Média	2,51 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,56 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>			

\*Dia 7 = dia da transferência do embrião; Dia 14 = uma semana depois

<sup>1</sup>Con = Controle; Bus = Buserelina; Desl = Deslorelina

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística

A taxa de gestação no diagnóstico inicial foi maior ( $p < 0,05$ ) para os animais do grupo Buserelina em comparação ao grupo controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Proporção de vacas gestantes ao primeiro diagnóstico de gestação (30 - 40 dias) em relação ao uso ou não de agonistas de GnRH

Tratamento	Gestante	Não gestante	Total
Controle	24,05% (19/79) <sup>b</sup>	75,95% (60/79)	79
Buserelina	38,27% (31/81) <sup>a</sup>	61,73% (50/81)	81
Deslorelina	28,05% (23/82) <sup>ab</sup>	71,95% (59/82)	82
<b>Total</b>	<b>30,17% (73/242)</b>	<b>69,83% (169/242)</b>	<b>242</b>

$p < 0,05$

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística.

Contrastes foram gerados no procedimento de modelos generalizados (GENMOD).

De 285 eventos tratados, 43 vacas não tiveram o primeiro diagnóstico de gestação, então 242 eventos foram analisados para o primeiro diagnóstico em relação aos tratamentos.

As taxas de gestação no diagnóstico final não foram diferentes ( $p = 0,32$ ) entre os tratamentos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Proporção de vacas gestantes no segundo diagnóstico de gestação (60 - 80 dias) em relação ao uso ou não de agonistas de GnRH

Tratamento	Gestante	Não gestante	Total
Controle	13,04% (12/92)	86,96% (80/92)	92
Buserelina	20,93% (18/86)	79,07% (68/86)	86
Deslorelina	14,61% (13/89)	85,39% (76/89)	89
<b>Total</b>	<b>16,10% (43/267)</b>	<b>83,90% (224/267)</b>	<b>267</b>

$p = 0,32$

Considerando-se o diagnóstico de gestação final (60 - 80 dias), de 285 eventos, 267 foram analisados.

As perdas embrionárias foram semelhantes ( $p = 0,97$ ) entre os tratamentos, tendo sido de 20% (3/15), 21,74% (5/23) e 23,53% (4/17) para controle, Buserelina e Deslorelina, respectivamente.

### **Discussão**

A correlação positiva ( $r^2 = 0,37$ ;  $p = 0,05$ ) do diâmetro do CL acessório com a concentração de progesterona, independentemente dos tratamentos, corrobora, em parte, os resultados de Marques et. al (2012) nos quais o diâmetro médio maior do CL acessório foi associado a concentrações mais elevadas de progesterona.

O aumento na proporção de vacas com presença de CL acessório no grupo tratado com Buserelina está de acordo com o estudo de Rajamahendran et al. (1998), porém em relação à Deslorelina, os resultados divergem. Esses autores, utilizando injeção de Buserelina (8  $\mu\text{g}$ , i.m.) e implantes de Deslorelina em diferentes doses (75, 150, 700 e 2100  $\mu\text{g}$ ) no 5º dia do ciclo estral, observaram que houve indução da ovulação extra em todas as vacas, formando-se estruturas semelhantes na aparência ao CL espontâneo. Os mesmos autores verificaram, também,

que com a dose mais baixa de Deslorelina já foi possível induzir a formação de CL acessório. A diferença de resultado entre este e aquele estudo em relação à Deslorelina pode ser a forma de administração. No presente estudo foi feita aplicação intramuscular, e no estudo de Rajamahendran et al. (1998) foram colocados implantes subcutâneos, porém os autores não relataram o período, mas, por ser implante, o tempo de ação normalmente é mais longo e isso pode ter diferido da aplicação intramuscular. Ainda, diferindo em parte dos resultados deste estudo, o tratamento com agonista de GnRH (8 µg de Buserelina) no dia 5 do ciclo estral provocou ovulação e formação de um CL induzido em todas as fêmeas tratadas (Schmitt et al., 1996). Essa proporção aproximou-se do dobro daquela encontrada no presente estudo com o uso de Buserelina (51,06%). Resultados ainda mais inferiores (25,7%) do que os daqueles autores foram reportados por Stevenson et al. (2008). Essas diferenças podem estar relacionadas com as dosagens, tipo de agonista e de outras condições não controladas entre os ensaios.

Embora não seja comparável ao presente estudo, em relação ao produto utilizado em si, o objetivo de induzir a ovulação e formar CL acessório é o mesmo quando se aplica hCG após a IA. Por exemplo, o

tratamento com hCG sete dias pós a IA, provocou o aparecimento de nova estrutura luteal 14 dias após a inseminação em 90,6% das vacas tratadas (Dahlen et al., 2010), valor superior aos encontrados em nosso estudo. Entretanto, em outro estudo (Stevenson et al., 2008), a formação de CL acessório com o uso de hCG (50,0%) foi semelhante a do presente estudo com a Buserelina. Em casos nos quais o hCG foi mais eficaz do que o GnRH para aumentar a produção de P4 pelo CL (Schmitt et al., 1996; Stevenson et al. 2007; Beltran e Vasconcelos, 2008), uma possível explicação seria que o hCG tem meia vida mais longa que o GnRH, e por consequência, tem seu efeito luteotrófico prolongado (Khoramian et al., 2011). Tanto o uso de agonistas de GnRH quanto de hCG apresenta resultados conflitantes e dependem de condições experimentais, o que limita comparações definitivas de acordo com a literatura estudada.

O intuito de aumentar as concentrações de P4 pela formação de corpos lúteos acessórios não foi atingido com a aplicação de agonistas de GnRH, no presente estudo. Esse resultado é consistente com o de Stevenson et al. (2007), que relataram que apesar de observarem a formação de CL acessório, como no presente estudo, o uso de Gonadorelina entre os dias 4 - 9 após a IA não provocou diferença na

concentração de P4. Kaygusuzoglu et al. (2010), usando 10,5 µg de Buserelina sete dias após a inseminação, também não observaram alterações nas concentrações de P4 de novilhas prenhes durante 24 dias após a IA. Porém, outros resultados demonstram uma associação entre a formação de CL acessório e concentrações de P4, diferindo em parte do presente estudo. Willard et al. (2003) observaram que as concentrações de P4 aumentaram em vacas de leite submetidas ao estresse calórico tratadas com GnRH no dia 5 após a IA. Mas, similarmente ao presente resultado, o uso de GnRH no dia 11 pós IA não alterou a P4. É possível que o folículo dominante não estivesse sensível no dia 11 em comparação com o dia 5. Comparativamente, o momento de aplicação dos agonistas de GnRH no presente estudo (D7) foi intermediário. Contudo, não foi possível explicar a dissociação entre as concentrações de P4 e a formação de CLs acessórios, tampouco a diferente resposta, quanto a CLs acessórios entre a Buserelina e a Deslorelina. De forma diferente desse estudo, a aplicação de Gonadorelina, Buserelina e Deslorelina no estro foi capaz de aumentar as concentrações de P4 (Ullah et al., 1996; Rajamahendran et al., 1998). Essa maior produção de P4 pode estar ligada à hipertrofia e hiperplasia do CL (Shahneh et al., 2008), o que poderia, em

parte, explicar a observação de efeitos positivos sobre a produção de P4 independentemente da produção de CLs acessórios. Aparentemente, um dos motivos que podem alterar a resposta a aplicação de agonistas de GnRH, é o momento da onda folicular em que eles são aplicados. A aplicação de 10 µg de Buserelina 4 dias mais tarde em relação ao momento de colocação dos embriões do presente estudo, promoveu aumento na concentração de P4 no plasma entre o dia da TE (d = 0) e o dia 8 após a mesma (Galimberti et al., 2001). Esse resultado foi diferente do presente estudo, podendo estar relacionado ao fato de que aqueles autores compararam as diferenças de P4 entre o dia da TE e 8 dias depois e não os valores absolutos, como no nosso caso, ressaltando-se que a P4 do dia 7 foi utilizada como covariável nas análises.

Considerando-se somente o primeiro diagnóstico de gestação (30 - 40 dias), a Buserelina aumentou a taxa de gestação em relação ao controle. De forma semelhante ao presente estudo, embora aplicada no momento do estro e relativo a IA, Kaim et al. (2003) relataram aumento de 14,2% na taxa de gestação com o uso de Buserelina. Já, com aplicação de Gonadorelina cinco dias após a IA em vacas em lactação (Howard et al., 2006), a taxa de gestação aos 40 dias (26,7%) foi inferior à encontrada

no presente trabalho com uso de Buserelina (38,3%). Campanile et al. (2007), trabalhando com bubalinos, diferentemente do presente resultado, não encontraram melhoras nas taxas de gestação aos 26 dias após a IA com o uso da Buserelina 5 dias após a inseminação. Não obstante, a taxa geral de gestação observada por esses autores foi superior às observadas no presente experimento (63,6% vs 30,17%), independentemente dos diversos tratamentos aplicados nos dois estudos.

No diagnóstico final de gestação (60 - 80 dias) não houve diferença entre os grupos, neste trabalho. De maneira semelhante, a taxa de gestação 55 dias após a IA não foi aumentada com a administração de GnRH nos dias 5 ou 15 (Bartolome et al., 2005). Também, Galimberti et al. (2001) observaram que não houve diferença na taxa de gestação entre as vacas tratadas (65,0%) com GnRH (Buserelina) quatro dias após a TE e o grupo controle (63,6%). Apesar de não ter havido diferença no trabalho desses autores, as taxas de gestação foram maiores que as deste trabalho, refletindo a maior viabilidade de embriões produzidos *in vivo* e implantados em receptoras mestiças Holandês X Zebu, mais adaptadas ao clima tropical brasileiro. Em contraste, as receptoras desse experimento eram da raça Holandesa, localizadas em região de clima tropical e os

embriões produzidos *in vitro*. Por outro lado, Marques et al. (2012) relataram que 10 µg de Buserelina no dia 7 do ciclo estral promoveram aumento na taxa de gestação de receptoras mestiças que receberam embriões congelados que foram produzidos *in vivo*. Khoramian et al. (2011) constataram que a taxa gestação por IA, aos 45 dias, em vacas que receberam 20 µg de Buserelina 5 - 6 dias pós IA, não foi diferente do grupo controle. Esse resultado está de acordo com o estudo em questão, no qual não foi observada diferença entre Buserelina e controle.

Vacas tratadas com GnRH 14 dias após a ovulação apresentaram melhora significativa nas taxas de gestação (20,3% vs 12,7%) em relação às vacas controle (Franco et al., 2006). Já no presente experimento, as proporções de vacas gestantes dos grupos Buserelina e controle foram 20,9% e 13,0%, respectivamente, porém essa diferença não foi significativa, provavelmente em função do menor número de animais por tratamento (241 vs 86 eventos). Lopez-Gatius et al. (2006) aplicaram Gonadorelina no dia da IA (GnRH-0), ou GnRH no dia da IA e 12 dias após (GnRH-0 + 12), ou não trataram (controle) e observaram que a probabilidade de gestação dos animais do grupo controle e do grupo GnRH-0 diminuiu por um fator de 0,46 e 0,80, respectivamente, em

comparação ao grupo GnRH-0 + 12. As duas doses de GnRH podem ter eliminado os problemas de infertilidade do período quente do ano, uma vez que a taxa de concepção foi (35%) para esses animais, sendo que na estação fria a taxa registrada foi de (34%). Considerando-se que o presente experimento foi realizado em clima quente também, não foi observada melhora na taxa de gestação, ressaltando-se que foi realizada transferência de embriões produzidos *in vitro*. Ainda, Shahneh et al. (2008) relataram que houve melhora na taxa de gestação quando as vacas foram tratadas com GnRH no momento da IA, visto que, 55% das vacas que receberam GnRH ficaram gestantes e 25% do grupo controle ficaram gestantes, sendo essa diferença, significativa.

### **Conclusão**

Os agonistas de GnRH não melhoraram a taxa de gestação final e não alteraram as concentrações de P4 no presente estudo, embora a proporção de vacas com CL acessório tenha sido maior com uso de Buserelina.

## Referências

- Bartolome JA, Melendez P, Kelbert D, Swift K, McHale J, Hernandez J, Silvestre F, Risco CA, Arteché ACM, Thatcher WW, Archbald LF, 2005: Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* **63**, 1026-1037.
- Bech-Sabat G, Lopez-Gatius F, Garcia-Ispuerto I, Santolaria JP, Serrano B, Nogareda C, de Sousa NM, Beckers JF, Yaniz J, 2009: Pregnancy patterns during the early fetal period in high producing dairy cows treated with GnRH or progesterone. *Theriogenology* **71**, 920-929.
- Beltran MP, Vasconcelos JLM, 2008: Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia-Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences* **60**, 580-586.
- Campanile G, Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Prandi A, Galiero G, D'Occhio MJ, 2007: Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* **67**, 1393-1398.
- Dahlen CR, Bird SL, Martel CA, Olson KC, Stevenson JS, Lamb GC, 2010: Administration of human chorionic gonadotropin 7 days after fixed-time artificial insemination of suckled beef cows. *Journal of Animal Science* **88**, 2337-2345.
- Franco M, Thompson PM, Brad AM, Hansen PJ, 2006: Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* **66**, 945-954.

- Galimberti AM, Fonseca FA, Araujo MCC, da Costa EP, de Freitas C, Guimaraes JD, Ferreira AD, 2001: Pregnancy rate and plasma progesterone concentrations in bovine embryo recipients treated with buserelin after embryo transfer. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **30**, 353-359.
- Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Nogareda C, Lopez-Bejar M, De Rensis F, 2006: Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* **65**, 799-807.
- Howard JM, Manzo R, Dalton JC, Frago F, Ahmadzadeh A, 2006: Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* **95**, 224-233.
- Kaim M, Bloch A, Wolfenson D, Braw-Tal R, Rosenberg M, Voet H, Folman Y, 2003: Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *Journal of Dairy Science* **86**, 2012-2021.
- Kaygusuzoglu E, Yildiz H, Kaya M, Cenesiz M, 2010: Effect of GnRH Administered 7 Days after Insemination on Serum Progesterone, Luteinizing Hormone and Duration Estrous Cycle with Pregnancy Rates in Heifers. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **9**, 1400-1405.
- Khoramian B, Farzaneh N, Garoussi MT, Mohri M, 2011: Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. *Research in Veterinary Science* **90**, 312-315.
- Lopez-Gatius F, Santolaria R, Martino A, Deletang F, De Rensis F, 2006: The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. *Theriogenology* **65**, 820-830.

- Marques M, Nasser L, Silva R, Bó G, Sales J, Filho MS, Reis E, Binelli M, Baruselli P, 2012: Follicular dynamics and pregnancy rates in *Bos taurus* x *Bos indicus* embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. *Animal Reproduction* **9**, 111-119.
- National Research Council, 2001: Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7<sup>th</sup> rev. ed. edn. National Academy of Science, Washington, DC, p. 381.
- Rajamahendran R, Ambrose JD, Schmitt EJP, Thatcher MJ, Thatcher WW, 1998: 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* **50**, 1141-1155.
- Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC, 2002: High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **85**, 2831-2842.
- SAS, 2002: A Handbook of Statistical Analyses using SAS, 2<sup>nd</sup> ed. edn., Boca Raton; London; New York; Washington, D.C., p. 351.
- Schmitt EJP, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, Thatcher WW, 1996: A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *Journal of Animal Science* **74**, 1915-1929.
- Shahneh AZ, Mohammadi Z, Fazeli H, Babak MMS, Dirandeh E, 2008: The Effect of GnRH Injection on Plasma Progesterone Concentrations, Conception Rate and Ovulation Rate in Iranian Holstein Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **7**, 1137-1141.

- Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S, DeJarnette JM, 2007: Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science* **90**, 331-340.
- Stevenson JS, Tiffany SM, Inskeep EK, 2008: Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Dairy Science* **91**, 3092-3101.
- Ullah G, Fuquay JW, Keawkhong T, Clark BL, Pogue DE, Murphey EJ, 1996: Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress. *Journal of Dairy Science* **79**, 1950-1953.
- Willard S, Gandy S, Bowers S, Graves K, Elias A, Whisnant C, 2003: The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* **59**, 1799-1810.