

EFEITO DA INFUSÃO DE GnRH NOS PERFIS DE LH E NA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS ÀS 7 SEMANAS PÓS-ARTO EM VACAS DE CARNE EM DIFERENTE CONDIÇÃO CORPORAL

L. PINTO ANDRADE*, S. RHIND**, I. WRIGHT** E S. McMILLEN**

*Escola Superior Agrária de Castelo Branco
Quinta da Sr^a de Mércules, 6000 Castelo Branco

** Macaulay Land Use Research Institute
Craigiebuckler, Aberdeen, AB9 2QJ, Scotland

(Este artigo foi aceite para publicação em 15 de Setembro de 1994)

RESUMO

Foi realizada uma experiência com o objectivo de testar a hipótese do anestro pós-parto ser superior em vacas de carne em baixa condição corporal (CC) devido a uma reduzida libertação de LH. Vacas Blue-Grey (Shorthorn x Galloway) parindo quer em baixa CC (grupo B constituído por 24 animais, CC média de 2,07 (s.e. $\pm 0,05$)) quer em alta CC (grupo A constituído por 12 animais, CC média de 2,81 (s.e. $\pm 0,08$)) foram alimentadas de modo a manterem a CC após o parto. Das 5 às 7 semanas pós-parto, metade das vacas no grupo B foram submetidas a uma infusão com 2 μ g de GnRH em 2 ml de uma solução salina (G) cada 2 horas, tendo-se conseguido induzir ovulação em 10 das 12 vacas. Todas as outras vacas foram submetidas a uma infusão só com uma solução salina (S) durante o mesmo período e a ovulação foi induzida somente em 1 das 12 vacas em alta CC e em uma das 11 vacas em baixa CC.

Os perfis de libertação de gonadotrofinas, a frequência e a amplitude da libertação de LH, não foram afectados, quer pela infusão com GnRH, quer pela CC. O número de folículos pequenos (3-7,9 mm de diâmetro) e grandes (≥ 8 mm de diâmetro) presentes à 7^a semana pós-parto, o número de receptores para a LH na teca e na granulosa e de FSH na granulosa, bem como o número de células da granulosa presentes nos folículos grandes à 7^a semana pós-parto, não evidenciam diferenças significativas ($P > 0,05$).

As concentrações intrafoliculares de estradiol, testosterona e IGF-I nos folículos grandes, à 7^a semana pós-parto, não foram significativamente afectados, nem pela infusão de GnRH, nem pela CC. Contudo, observou-se uma tendência para elevadas concentrações de estradiol em vacas em alta CC quando comparada com vacas em baixa CC.

Os resultados sugerem que a infusão de GnRH acelerou o processo de desenvolvimento folicular nas vacas em baixa CC; outros factores além da CC poderão estar envolvidos no desenvolvimento folicular.

1- INTRODUÇÃO

Alguns estudos mostraram que vacas com baixa condição corporal (CC) apresentam uma menor frequência de libertação de LH do que vacas com alta CC, (Wright *et al.*, 1987,

1990, 1992a); além disso, existem evidências de que o desenvolvimento dos folículos com elevada capacidade de síntese de estradiol é retardado no pós-parto de vacas de baixa CC (Prado *et al.*, 1990). Contudo, a acção da frequência de libertação de LH não está perfeitamente esclarecida; alguns estudos mostraram não haver efeito da CC na frequência de libertação de LH, nem ser linear a relação entre a frequência da libertação de LH e o desenvolvimento de folículos ovários (tamanho e estrutura) e a sua função (capacidade estrogénica, receptores hormonais produção de IGF-I) (Rhind *et al.*, 1992).

O objectivo deste estudo é testar a hipótese de que a infusão de GnRH em vacas no pós-parto com baixa CC iria aumentar: a taxa de crescimento folicular, a população de células da granulosa e a capacidade de síntese de esteróides pelos tecidos da teca e da granulosa, quando comparada com animais submetidos somente a uma infusão com uma solução salina como controlo. Parte-se ainda do pressuposto que as possíveis alterações a nível do folículo são mediadas através de alterações nas concentrações dos receptores para as gonadotrofinas, localizadas ao nível dos tecidos da teca e da granulosa.

A infusão foi realizada por um período mínimo de 14 dias, pois a duração normal de um período de crescimento folicular até à maturidade (período pré-ovulatório) é cerca de 7 a 10 dias (Knopf *et al.*, 1989); partiu-se pois do pressuposto de que o tratamento seria suficiente para aumentar o desenvolvimento da capacidade estrogénica dum folículo durante pelo menos uma onda de crescimento folicular e provavelmente durante uma segunda onda.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Animais e manejo

Foram usadas trinta e seis vacas multíparas Blue-Grey (White Shorthorn x Galloway) inseminadas após sincronização deaios e com data prevista de parto em Março. Aos 110 dias antes da data prevista para o parto, as vacas apresentavam uma média de peso vivo (\pm sd) de 506.61 kg e uma média de CC (.sd) de 2.8.0.3. (Para avaliação da CC foi usada a escala de 6 pontos (0 = muito magra e 5 = muito gorda) proposta por Lowman *et al.* (1976). Na mesma altura as vacas foram distribuídas aleatoriamente por três grupos em função do peso e CC. Nenhuma vaca de cada grupo podia perder mais de 0.5 ou ganhar mais de 0.75 unidades da CC. Dois grupos de vacas foram alimentadas de modo a atingirem uma baixa CC ao parto (B), (CC = 2; n = 12 por grupo). O terceiro grupo foi alimentado de modo a alcançar uma alta CC ao parto (A) (CC = 3; n = 12). Todas as vacas foram alimentadas individualmente. Vacas do grupo A foram alimentadas com uma média (.sd) de 22.4.2 kg de silagem e as vacas do grupo B foram alimentadas com 12.8-2.1 kg. A água foi fornecida *ad libitum*.

Após o parto, as vacas foram alimentadas individualmente com quantidades variáveis de concentrado e silagem. Esta alimentação forneceu um valor estimado de 0.23 MJ de energia metabolizável (ME) por kg de peso vivo/dia tendo sido calculadas para manutenção de peso vivo e CC (Wright *et al.*, 1990). A quantidade de concentrado dado às vacas foi ajustado semanalmente de acordo com o peso vivo.

As vacas foram alojadas em cubículos individuais e os seus vitelos em cubículos adjacentes, tendo acesso às mães para amamentação, duas vezes por dia, durante 30 minutos (08.00 e 16.00 h.).

2.2- Tratamentos experimentais

Vinte e quatro horas após o parto, as vacas do grupo B foram pesadas, avaliada a sua CC e divididas em pares de animais com idêntica CC, sendo distribuídas aleatoriamente dentro de cada par por dois grupos de tratamento: um grupo submetido somente a infusão com uma solução salina (BS) e o outro grupo com a infusão de GnRH (BG). As vacas do grupo A foram submetidas a uma infusão com uma solução salina (AS).

Às 5 semanas pós-parto cada vaca do grupo BG foi sujeita a infusão com 2 .g de GnRH em 2 ml de uma solução salina. Usou-se uma bomba peristáltica (Ismatec, SA; Laboratoriumstechnik, Glatbrugg-Zurich, Germany), através de um tubo de transmissão (IV 1000.T.M.S. Consultastes, Yeovil, Somerset, UK) até ao catéter colocado na jugular. A bomba era activada durante 1 minuto cada 2 horas, durante 14 a 18 dias, começando aproximadamente às 5 semanas pós-parto. Foram recolhidas amostras de sangue através de uma venepunctura da jugular, três vezes por semana (Segundas, Quartas e Sextas-feiras). Foram ainda recolhidas amostras de sangue de todas as vacas através de um catéter na jugular de 20 em 20 minutos, durante 10 horas (09.00 às 19.00h.) à 5ª semana em dois dias consecutivos (período de pré-infusão), 6ª semana (7º dia de infusão) e 7ª semana pós parto (14º dia de infusão). A inserção de catéteres na jugular foi efectuada no dia anterior à recolha de amostras frequentes.

Todas as amostras de sangue foram recolhidas para tubos com heparina (10 UI/ml de sangue), centrifugados até 30 minuto após a recolha a uma velocidade de 1000G durante 30 minutos. O plasma foi recolhido e armazenado a -20 °C até às determinações hormonais.

A 7ª semana pós-parto efectuaram-se ovariectomias em todas as vacas através de um aparelho cirúrgico desenhado para provocar o seccionamento do ovário e simultaneamente a hemostase, utiliza-se uma laparotomia lombar após uma anestesia local para vertebral.

2.3- Dissecção de folículos ováricos e medições associadas

Após a ovariectomia todos os folículos com diâmetro > 3 mm e < 8 mm, são contados. Foram medidos dois diâmetros perpendiculares dos folículos (segundo o eixo maior e menor) com uma aproximação mínima de 0,5 mm (usando uma lupa microscópica equipada com uma ocular micrométrica). Folículos ≥ 8 mm de diâmetro foram abertos e as células da granulosa foram separadas das células do tecido da teca com uma espátula redonda de plástico.

O fluído folicular e as células da granulosa foram removidas para tubos de poliestireno (LP4, LuclidamLtd, Sussex, UK).O folículo foi lavado duas vezes com 1ml de meio de cultura 199 com Hepes (Flow Laboratories, Rickmansworth, UK); as restantes células da granulosa e o meio de cultura obtidos após lavagem foram transferidos para o tubo LP4.

As células da granulosa foram separadas do fluído folicular por centrifugação durante 10 minutos a 100G e o sobrenadante foi transferido para pequenos recipientes e armazenado a -20 °C para posterior determinação das concentrações de esteróides .

O volume folicular foi estimado tendo como base a média do diâmetro folicular e assumindo a esfericidade dos folículos. As concentrações intrafoliculares das hormonas esteróides (testosterona e estradiol) foram posteriormente calculadas usando as concentrações da hormona na mistura do fluído folicular e do meio de cultura, corrigidos de acordo com o grau de diluição com o meio de cultura.

2.3.1- Células da granulosa e da teca

Às células da granulosa foi novamente adicionado 1ml de meio de cultura 199 (com 0.1% de soro de albumina de bovino (BSA) (Sigma Chemical Co Ltd., Poole, Dorset, UK). O número de células da granulosa foi determinado usando um hematocítmetro. O meio de cultura e as células da granulosa foram armazenada sem azoto (N) líquido para posterior determinação do número de receptores de LH e FSH.

O tecido da teca foi separado da parede do folículo com a ajuda de pinças. Metade do tecido foi armazenado em N líquido para determinação das concentrações de receptores de LH e FSH e o restante tecido foi armazenado a -20 °C, para determinação da proteína, com o objectivo de fornecer um índice da quantidade de tecido presente.

2.3.2- Determinação de hormonas

Todas as amostras de plasma sanguíneo recolhidas durante o período intensivo de 10 horas foram analisadas para determinação da LH e cada terceira amostra foi analisada para determinação de FSH. As amostras de plasma recolhidas 3 vezes/semana foram analisadas para determinação da progesterona.

O fluido folicular dos folículos ≥ 8 mm de diâmetro, foram analisados em duplicado para determinação das concentrações de testosterona, estradiol e IGF-I.

As células da granulosa e o tecido da teca foram analisados para determinação das concentrações de receptores de LH e FSH.

Todas as determinações hormonais foram analisadas num computador PC usando o software Riasmart (Hewlett-Packard, Canberra, UK).

2.3.2.1- Hormona Luteinizante (LH) e hormona folículo estimulante (FSH)

As amostras de plasma foram analisadas para a LH usando as técnicas de radioimunoensaio descritas por McNeilly *et al.* (1986). O reagente usado para marcação da hormona e para determinação da curva foi o USDA-bLH-1. A sensibilidade do ensaio foi 0.2 ng/ml Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram 6.7% e 5.8% respectivamente.

As determinações de FSH foram efectuadas usando as técnicas de radioimunoensaio descritas por McNeilly *et al.* (1976). O reagente usado para marcação da hormona foi NIADDIK-oFSH-I-1 e o usado para determinação da curva foi USDA-b-FSH-B I. A sensibilidade do ensaio foi de 2.5 ng/ml Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram respectivamente de 6.9% e 6.2%.

2.3.2.2- Factor de crescimento tipo insulina- I (IGF-I)

A determinação das concentrações intrafoliculares de IGF-I foi efectuada de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Bruce *et al.* (1991). A marcação radioactiva da hormona foi efectuada segundo a técnica descrita por Reay (1982), como recombinante da IGF-I. IGF-I (Peninsula Laboratories Ltd., Merseyside, UK) foi usado para determinação da curva do ensaio. A sensibilidade do ensaio foi 0.24 ng/ml. Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram de 7.4% e 9.8%, respectivamente.

2.3.2.3- Progesterona

A determinação das concentrações de progesterona no plasma foi efectuada de acordo com as técnicas de radioimunoensaio descritas por Djahanbakhch *et al.* (1981) e modificadas por McNeilly e Fraser (1987). A sensibilidade do ensaio foi 0.08 ng/ml. Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram de 10.5% e 12.5%, respectivamente.

2.3.2.4- Estradiol e testosterona

As amostras de fluído folicular foram analisadas para a determinação de estradiol e testosterona usando as técnicas descritas por Webb *et al.* (1985).

A marcação radioactiva do estradiol foi feito de acordo com a técnica de Hunter e Greenwood (1962) e o bEstradiol (N°E8875, Sigma, Dorset, UK) foi usado para determinação da curva do ensaio e a sensibilidade do ensaio foi de 0.05 ng/ml. Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram respectivamente de 10.2% e 11.1%.

Foi usado como marcador radioactivo para a testosterona, o Testosterone-3CMO-Histamine (MRC, Edinburgh) e o 4-Androsten-17B-ol-3-one (N° T-1500, Sigma, Dorset, UK) foi usado na determinação das curvas do ensaio. A sensibilidade do ensaio foi de 0.025 ng/ml. Os coeficientes de variação dentro e entre ensaios foram 6.1% e 7.4%, respectivamente.

2.3.2.5- Determinação de receptores e proteína

Na determinação de receptores de LH e FSH nos tecidos da teca e da granulosa foi usada a técnica descrita por Bramley *et al.* (1987) e na determinação da quantidade de proteína no tecido tecal foi usada a técnica colorimétrica de Lowry *et al.* (1951). Os resultados da determinação dos receptores vêm expressos como picogramas de hormona marcada [¹²⁵I] por miligrama de proteína.

2.4- Análise estatística

A libertação de LH definida de acordo com Baird *et al.* (1981), ocorre quando dois valores consecutivos são superiores aos dois valores que os precedem, (frequência de libertação) e quando o valor do mais elevado (a amplitude da libertação) excede o valor da média basal pelo menos quatro vezes o coeficiente de variação do ensaio.

Os efeitos principais da CC e da infusão de GnRH nos perfis gonadotróficos, no número de pequenos e grandes folículos presentes à ovariectomia foram comparados por análise de variância usando o programa Genstat 5, versão 3.1 (Lawes Agricultural Trust, 1992).

Os folículos foram arbitrariamente divididos em duas classes de acordo com a concentração de estradiol no fluído folicular, isto é, folículos com uma produção menor do que 10000pg/ml (E2 Baixo) ou maior do que 10000pg/ml (E2 Alto). Todas as análises estatísticas das concentrações de hormonas no fluído folicular, as concentrações de receptores e o número de células na granulosa foram efectuadas segundo um critério restrito de máxima verosimilhança (REML Restricted maximum likelihood) feita pelo programa Genstat 5. O modelo compreendeu efeitos fixos para o tratamento, classe de produção de estradiol e as interacções entre o tratamento e a classe de produção de estradiol como efeito aleatório de cada vaca. Toda a informação dos folículos foi analisada usando este modelo

e quando foi encontrada qualquer diferença estatística significativa na interacção entre tratamentos pela classe de folículos, foi efectuado um t-test.

Quando os dados não apresentaram uma distribuição normal, os valores foram transformados numa escala logarítmica antes de ser efectuada qualquer análise estatística; isto resulta numa maior distribuição simétrica dos dados. Esta transformação foi utilizada na determinação dos perfis gonadotróficos, concentrações intrafoliculares de esteróides e IGF-I, concentrações de receptores e número de células da granulosa. Para o propósito de apresentação e interpretação, a média dos valores foram transformados no inverso dos logaritmos antes da apresentação, contudo, o erro padrão das diferenças entre médias é expresso nas unidades transformadas com o objectivo de comparações estatísticas.

O teste de Fisher's foi usado na comparação da incidência de ovulações.

3- RESULTADOS

3.1- Peso vivo e condição corporal

A condição corporal (CC) e o peso vivo (PV) ao parto foram eficazmente manipulados. Aos 110 dias antes da data prevista para o parto, as vacas apresentaram uma média (. se) de PV de 506 ± 13.2 kg e uma média (. se) de CC de 2.8 ± 0.07 . Enquanto a CC e o PV foram mantidos até ao parto nas vacas em alta CC (AS), as vacas dos grupos BS e BG perderam cada uma aproximadamente 100 kg.

Após o parto, a CC foi mantida até à ovariectomia (às 7 semanas pós parto), contudo, houve uma ligeira diminuição no PV em todos os grupos (Tabela 1).

TABELA 1- Média dos pesos vivos (Kg) e condições corporal de vacas em alta (A) ou baixa (B) condição corporal, submetidas a infusão com uma salina (S) ou GnRH (G) ao parto e à ovariectomia (7 semanas pós parto)

	Peso vivo						Condição Corporal					
	AS	s.e	BS	s.e	BG	s.e	AS	s.e	BS	s.e	BG	s.e
Parto	497.9	21.60	406.0	12.47	405.5	12.48	2.81	0.08	2.18	0.05	1.95	0.06
Ovariectomia	467.5	21.72	388.1	11.86	381.6	10.39	2.83	0.11	2.18	0.05	2.04	0.08

3.2- Perfis gonadotróficos à 5ª, 6ª e 7ª semana pós parto

3.2.1- Hormona luteinizante (LH), frequências e amplitudes de libertação de LH

A média geral das concentrações de LH no plasma (ng/ml) durante as 10 horas de recolha à 5ª semana (período de pré-infusão), 6ª semana (7º dia de infusão) e 7ª semana (14º dia de infusão) pós parto não foram significativamente afectados quer pela CC, quer pela infusão com GnRH (Tabela 2). Contudo, a média da concentração de LH foi significativamente maior à 6ª semana pós parto do que à 5ª ou 7ª semana pós parto (1.23 vs. 0.98 ng/ml, $p < 0.01$).

A média da frequência de libertação de LH (libertação/hora) e amplitude de libertação (ng/ml) não foram afectadas significativamente quer pela CC, infusão de GnRH, quer pelo tempo pós parto (Tabela 2). Contudo, à 7ª semana pós parto houve uma tendência para uma maior frequência de libertação de LH no grupo BG quando comparado com os grupos AS e BS (AS + BS: 0.23 vs. BG: 0.32, $p=0.06$).

TABELA 2 - Média logarítmica (concentrações) de LH (ng/ml) e média da frequência de libertação de LH (libertação/hora), amplitude da libertação (ng/ml) às 5, 6 e 7 semanas pós parto em vacas em alta (A) (A) ou baixa (B) condição corporal e submetidas a infusão com uma salina (S) ou com GnRH (G); (os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parêntesis; e. e. d. s. da concentração de LH são expressos em unidades logarítmicas).

	AS	BS	BG	s.e.d.		Significância		
				Entre Tratamentos	Entre Semanas	Tratamentos	Semana	Interação
Concentrações LH								
5ª semana	0.049 (1.12)	0.071 (1.17)	-0.074 (0.84)					
6ª semana	0.168 (.148)	0.021 (1.05)	0.078 (1.19)	0.062	0.075	NS	**	NS
7ª semana	-0.022 (0.95)	0.010 (1.02)	0.068 (1.17)					
Frequência libertação LH								
5ª semana	0.23	0.22	0.20					
6ª semana	0.21	0.23	0.18	0.045	0.049	NS	NS	NS
7ª semana	0.22	0.27	0.32					
Amplitude libertação LH								
5ª semana	2.63	1.92	1.85					
6ª semana	2.29	1.99	1.51	0.401	0.462	NS	NS	NS
7ª semana	2.09	2.24	2.52					

3.2.2- Hormona folículo estimulante (FSH)

A média das concentrações no plasma de FSH (ng/ml) não foram afectadas significativamente quer pela CC, quer pela infusão de GnRH, quer pelo tempo pós parto (Tabela 3).

3.3- Populações dos folículos ováricos e estado fisiológico

3.3.1- População de folículos e taxa de ovulação

Os efeitos da CC e da infusão de GnRH na população de folículos e na taxa de ovulação às 7 semanas pós parto podem observar-se na Tabela 4. O número de folículos pequenos (3-7.9 mm de diâmetro) e grandes (≥ 8 mm de diâmetro) não foi significativamente afectado nem pela CC, nem pela infusão com GnRH.

TABELA 3 - Média logarítmica (concentrações) de FSH (ng/ml) à 5ª, 6ª e 7ª semanas pós parto em vacas em alta (A) ou baixa (B) condição corporal e submetidas a uma infusão com uma solução salina (S) ou com GnRH (G); (os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parentesis, s.e.d. são expressos em unidades logarítmicas).

	AS	BS	BG	s.e.d.		Significância		
				Entre Tratamento	Entre Semanas	Tratamento	Semanas	Interação
5ª semana	1.131 (13.53)	1.009 (10.21)	1.068 (11.70)					
6ª semana	1.243 (17.51)	1.042 (11.01)	0.993 (9.84)	0.091	0.155	NS	NS	NS
7ª semana	1.180 (15.13)	0.975 (9.43)	1.094 (12.43)					

TABELA 4- Média logarítmica (concentrações) de LH (ng/ml) e média da frequência de libertação de LH (libertação/hora), amplitude da libertação (ng/ml) às 5, 6 e 7 semanas pós parto em vacas em alta (A) ou baixa (B) condição corporal e submetidas a infusão com uma solução salina (S) ou com GnRH (G); (os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parêntesis, s.e.d.s. da concentração de LH são expressos em unidades logarítmicas).

	AS	BS	BG	s.e.d		Significância		
				Entre Tratamentos	Entre Semanas	Tratamentos	Semana	Interação
Concentrações LH								
5ª semana	0.049 (1.12)	0.071 (1.17)	-0.074 (0.84)					
6ª semana	0.169 (1.48)	0.021 (1.05)	0.078 (1.19)	0.062	0.075	NS	**	NS
7ª semana	-0.022 (0.95)	0.010 (1.02)	0.068 (1.17)					
Frequência libertação LH								
5ª semana	0.23	0.22	0.20					
6ª semana	0.21	0.23	0.18	0.045	0.049	NS	NS	NS
7ª semana	0.22	0.27	0.32					
Amplitude libertação LH								
5ª semana	2.63	1.92	1.85					
6ª semana	2.29	1.99	1.51	0.401	0.462	NS	NS	NS
7ª semana	2.09	2.24	2.52					

Não houve nenhum efeito da CC na taxa de incidência de ovulação com apenas 1/11 e 1/12 vacas ovuladas em cada um dos grupos BS e AS. Contudo, no grupo BG houve um aumento significativo da taxa de ovulação (10/12; $p < 0.001$). (Estes animais são fisiologicamente diferentes como o são também os seus folículos). Concentrações de progesterona $> 1.5\text{ng/ml}$, foram obtidas em 10 das 12 amostras de plasma recolhidas três vezes por semana, desde o parto até à ovariectomia em cada um dos animais que ovulou, excepto em 2 das 10 vacas que ovularam no grupo BG. Não foram obtidos dados de um animal no grupo BS pois os ovários não conseguiram ser recolhidos devido a adesões ováricas.

A ovulação foi suposto ter ocorrido três dias antes do aparecimento de concentrações de progesterona superiores a 1.5ng/ml . Durante o período intensivo de recolha de amostras de plasma à 6ª semana, nenhum animal apresentou elevadas concentrações de progesterona, enquanto à 7ª semana os níveis de progesterona foram elevados somente num animal no

grupo BG e em nenhum animal dos grupos AS e BS. A determinação da progesterona em subsequentes amostras indicou que 7 animais do grupo BG e que um animal de cada um dos grupos AS e BS ovularam durante a 7ª semana. O tempo de ocorrência da ovulação em dois dos animais do grupo BG com corpo lúteo (CL) não funcional, não pôde ser determinado pois as concentrações de progesterona não foram suficientemente elevadas.

3.3.2- Número de células da granulosa por folículo

O número de células da granulosa presentes nos folículos grandes (≥ 8 mm) à 7ª semana pós parto não foi afectado significativamente quer pela CC, quer pela infusão com GnRH (Tabela 5).

TABELA 5- Média logarítmica (números) de células da granulosa presentes nos folículos ≥ 8 mm de diâmetro às 7 semanas pós parto em vacas em alta (A) ou baixa (B) condição corporal e submetidas a uma infusão com uma solução salina (S) ou com GnRH (G); (os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parêntesis; s.e.d.s são expressos em unidades logarítmicas).

AS	BS	BG	s.e.d.	Significância
6.53	6.43	6.67	0.190	NS
(3388442)	(2735269)	(4764309)		

3.3.3- Concentrações intrafoliculares de testosterona, estradiol e IGF-I

Os efeitos da CC e da infusão com GnRH nas concentrações intrafoliculares de esteróides e IGFI nos folículos grandes (≥ 8 mm de diâmetro) obtidos, à 7ª semana pós parto, podem ser observados na Tabela 6.

As concentrações de testosterona no fluído folicular não foram significativamente afectadas quer pela CC, quer pelo tratamento, quer pela classe de folículos (não estrogénicos (secreção de estradiol < 10000 pg/ml) e estrogénicos (secreção de estradiol > 10000 pg/ml) (Tabela 6).

Os folículos de vacas em alta CC apresentaram concentrações de estradiol 2 vezes superiores às dos folículos de vacas em baixa CC; no entanto, as diferenças não foram significativas ($p=0.058$). O efeito da infusão de GnRH, nas concentrações de estradiol não foi estatisticamente significativa, no entanto as concentrações de estradiol nos folículos estrogénico activos foram quase 50% superior nas vacas do grupo BG do que nas vacas do grupo BS.

Houve um efeito significativo na interacção classe de folículo x tratamento ($p < 0.05$); isto foi atribuído principalmente às baixas produções de estradiol nos folículos não estrogénicos das vacas do grupo AS.

As concentrações intrafoliculares de IGF-I não foram afectadas quer pela CC, quer pela infusão de GnRH quer pela classe de folículo (Tabela 6).

3.3.4- Concentrações de receptores de LH e FSH nos tecidos da teca e da granulosa

As concentrações de receptores para a LH nos tecidos da teca e da granulosa não foram significativamente afectados, nem pela CC, nem pela infusão com GnRH (Tabela 7).

TABELA 6- Média logarítmica (concentrações) de testosterona (pg/ml) estradiol (E2) (pg/ml) e IGF-I (ng/ml) no fluido folicular de folículos > 8 mm à 7ª semana pós-parto. Os folículos foram classificados como não estrogénicos (E2 baixo, secreção < 10000 pg por ml de fluido folicular) e estrogénico (E2 alto; secreção > 10000 pg por ml de fluido folicular). (Os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parêntesis; s.e.d.s. são expressos em unidades logarítmicas).

n	AS		BS		BG		s.e.d.	Significância		
	E2 baixo	E2 alto	E2 baixo	E2 alto	E2 baixo	E2 alto		Tratamento	Classe E2	Interação
Testosterona	4.172 (14859.4)	4.192 (15595.5)	4.145 (13963.7)	4.267 (18492.7)	4.247 (17660.4)	4.431 (26977.4)	0.175	NS	NS	NS
Estradiol	3.102 (1264.7)	4.821 (66221.6)	3.346 (2218.2)	4.487 (30690.2)	3.509 (3228.5)	4.650 (44668.4)	0.186	p=0.058	***	*
IGF-I	2.288 (194.1)	2.178 (150.6)	2.221 (166.3)	2.362 (230.1)	2.449 (281.2)	2.297 (198.2)	0.139	NS	NS	NS

TABELA 7- Média logarítmica (concentrações) (pg hormona ligada por mg tecido) de receptores de LH no tecido da teca e da granulosa e receptores de FSH no tecido da granulosa. Células da granulosa e tecido da teca têm origem nos folículos classificados como não estrogénicos (E2 baixo; secreção < 1000 pg por ml de fluido folicular). (Os valores do inverso dos logaritmos são dados entre parêntesis; s.e.d.s. são expressos em unidades logarítmicas).

Nº de folículos + Tecido da teca Receptor LH	AS		BS		BG		s.e.d.	Significância		
	E2 baixo	E2 alto	E2 baixo	E2 alto	E2 baixo	E2 alto		Tratamento	Classe E2	Interação
Nº de folículos + Tecido da Granulosa Receptor LH	1.563 (36.55)	1.644 (44.05)	0.962 (9.16)	1.542 (37.83)	0.686 (4.85)	1.318 (20.79)	0.432	NS	NS	NS
Receptor FSH	0.740 (5.49)	1.657 (45.39)	0.719 (5.23)	1.608 (40.55)	1.037 (10.88)	1.657 (45.39)	0.523	NS	*	NS

+ - Insuficiente tecido disponível para análise de receptores em alguns folículos.

Houve mais receptores para a LH no tecido da teca dos folículos estrogénicos, contudo este efeito foi maior nas vacas do grupo AS. Quanto às células da granulosa não se verificou este efeito. Houve um efeito significativo ($p < 0.05$) da interacção tratamento com GnRH x classe de folículo nos receptores de LH no tecido da teca, atribuído ao baixo número de receptores de LH nos folículos não estrogénicos de vacas em alta CC.

O número de receptores de FSH no tecido da teca não foi medido devido às pequenas quantidades de tecido disponível e ainda devido ao facto de não serem esperados grandes quantidades de receptores de FSH no tecido da teca. As concentrações de receptores de FSH no tecido da granulosa não foram significativamente afectadas nem pela CC, nem pela infusão com GnRH (Tabela 7). Houve um efeito significativo ($p < 0.05$) da classe de folículos nas concentrações de receptores de FSH no tecido da granulosa, apresentando os folículos estrogénicos concentrações 4 vezes superiores dos receptores da FSH do que os folículos não estrogénicos.

4- DISCUSSÃO

Neste estudo os níveis de ingestão impostos antes do parto foram eficazes pois foi possível alcançar as diferenças em CC prescritas ao parto, sendo esta diferença mantida durante o período de pós-parto. Isto implica que as diferenças observadas nos perfis hormonais e na função ovárica foram uma consequência da CC por si só, já que os animais estavam sujeitos a uma ingestão energética determinada previamente em função do seu peso corporal, destinada à manutenção da CC constante.

A- Perfis gonadotróficos

Os perfis gonadotróficos controlam o desenvolvimento dos folículos ováricos (Ireland, 1987). Especificamente, foram estabelecidas relações entre a frequência de libertação de LH quer com o nível energético de ingestão (Echternkamp *et al.*, 1982; Terqui *et al.*, 1982), quer com a CC (Wright *et al.*, 1990).

As concentrações médias de LH e FSH observadas neste estudo são semelhantes aos valores obtidos noutros estudos (Wright *et al.*, 1990, 1992a, 1992b). No entanto, a não existência de diferenças na frequência de libertação de LH com a CC neste estudo, é contrária aos resultados obtidos por Wright *et al.* (1990), mas coincidente com os resultados obtidos por Rhind *et al.* (1992). Os resultados obtidos até agora, sugerem que os efeitos da CC na actividade reprodutiva não são exclusivamente mediados através de diferenças da frequência de libertação de LH. O período do anestro pós-parto em vacas de carne é caracterizado por baixas frequências de libertação de LH e possivelmente de GnRH (Short *et al.*, 1990); foi sugerido que um aumento na frequência de libertação de LH, é condição necessária para que ocorra a ovulação (Peters *et al.*, 1981). Contrariamente ao ponto de vista de que um aumento da frequência de libertação de LH pode ser induzida através de injeções de baixa dosagem de GnRH (Riley *et al.*, 1981; McLeod *et al.*, 1985), neste estudo, a infusão de GnRH feita com pequenas doses não foi suficiente para induzir um aumento significativo quer da frequência de libertação de LH, quer da média das concentrações de LH; resultados semelhantes foram também obtidos por Jagger *et al.* (1987).

Embora a frequência de libertação de LH no grupo BG não tenha sido significativamente diferente daquela obtida pelos grupos AS e BS, 10 em 12 vacas do grupo BG ovularam e só 1 animal em cada um dos outros grupos ovulou. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores feitos com novilhas e com vacas em anestro pós parto e nas quais foi induzida a ovulação através de uma série de injeções de GnRH (Riley *et al.*, 1981; Walters *et al.*, 1982; McLeod *et al.*, 1985) indicando que a infusão afectou a função ovárica. Sabe-se ainda que de cada vez que existe uma libertação de GnRH do hipotálamo, esta está associada com uma libertação de LH (Clarke Cummins, 1982). Sugere-se pois que a não detecção de alterações significativas na frequência de libertação de LH após infusão de GnRH seja atribuída ao regime de recolha das amostras e não à incapacidade de induzir uma resposta.

Concentrações elevadas de progesterona só foram obtidas após os períodos intensivos de recolha de amostras para a determinação da frequência de LH, portanto a inexistência de um aumento da frequência de libertação de LH no grupo BG à 6ª e 7ª semana pós parto não pode ser atribuído a um feedback negativo da progesterona. É no entanto possível que a ocorrência de ovulações (indicada através dos níveis de progesterona) especialmente na 7ª semana possa ter originado um aumento da produção de estradiol pelos ovários e consequentemente ter induzido um efeito inibidor na frequência de libertação de LH no grupo BG.

Estudos recentes sugerem que alterações a curto prazo na secreção de FSH não podem ser explicados com base em modificações na frequência de libertação de GnRH (Chappel, 1985). A GnRH parece ser necessária para estimular a secreção de FSH, no entanto a relação directa que existe entre a secreção de GnRH e LH, não existe no que respeita à FSH (Clarke *et al.*, 1982).

Os resultados desta experiência confirmam observações prévias em ovelhas ovarioectomizadas (Clarke *et al.*, 1984, 1986) e nas quais as concentrações de FSH não foram alteradas após infusão com GnRH.

B- Desenvolvimento folicular

Os efeitos dos tratamentos nutricionais e dos perfis gonadotróficos na taxa de ovulação, devem ser regulados através de alterações no desenvolvimento folicular e na sua capacidade esteroidogénica.

Foi sugerido que um aumento no número de folículos de tamanho médio (4-7.9 mm de diâmetro) pode dar origem a um grupo de folículos a partir do qual os folículos ovulatórios são seleccionados; este processo de selecção é uma das etapas necessárias para que ocorra a ovulação (Spicer *et al.*, 1986a, 1987). O número de folículos pequenos (3-7.9mm) e grandes (≥ 8 mm) observados nesta experiência à 7ª semana pós parto, não foi afectado pela CC e é idêntico ao número de folículos observado em experiências anteriores obtidos à 9ª semana pós parto (Prado *et al.*, 1990). No mesmo estudo (Prado *et al.*, 1990) mas à 5ª semana pós parto, vacas em alta CC, tiveram um maior número de pequenos folículos do que vacas em baixa CC e Prado (1989) sugeriu que os mecanismos fisiológicos envolvidos no recrutamento, crescimento e desenvolvimento de folículos ováricos podem tornar-se funcionais mais cedo em vacas em alta CC. Contudo, quer no presente estudo, quer no de Prado (1989), as diferenças no estado fisiológico dos folículos (reflectida na actividade ovulatória) à 7ª e 9ª semana pós parto não foram afectados pelo tamanho dos folículos.

Só os folículos ≥ 8 mm de diâmetro têm a capacidade de se tornarem dominantes e ovularem (Spicer *et al.*, 1986a) e neste estudo, a capacidade dos folículos para crescer e atingirem um tamanho potencialmente ovulatório não foi limitado pela CC ao parto, pelo menos dentro da variação da CC usado neste estudo, pois todos os grupos apresentaram um número de folículos ≥ 8 mm de diâmetro semelhantes; A presença de folículos grandes, à 7ª semana pós parto em ambos os grupos AS e BS sugere que o crescimento folicular por si só não é inibido durante o período do anestropós parto. Isto está de acordo com trabalhos prévios feitos com vacas e nas quais se observou um nítido crescimento folicular após a 1ª semana pós parto, registando-se o aparecimento de folículos grandes várias semanas antes do aparecimento da primeira ovulação pós parto (Moss *et al.*, 1985; Spicer *et al.*, 1986a).

Em resumo, os resultados deste estudo indicam que a capacidade dos folículos para crescer e ovular não é um factor limitante no anestropós parto. A ovulação só ocorre quando um folículo altamente estrogénico é exposto a um determinado padrão de libertação de LH (Roche *et al.*, 1992). Contudo, a capacidade destes folículos grandes produzirem estradiol suficiente para induzir a ovulação pode ser o factor limitante.

C- Capacidade esteroidogénica dos folículos

A conversão dos androgénios em estradiol e a resposta das células da granulosa a estes esteróides é o factor mais importante na capacidade do folículo ovular ou regredir. Contudo, o controlo deste sistema é mais complicado e envolve também a produção de agentes locais, factores de crescimento tais como a IGF-I que estimulam e/ou inibem as acções das gonadotrofinas em células alvo (Dorrington *et al.*, 1987).

Neste estudo as concentrações de testosterona (um precursor do estradiol) no fluído folicular de folículos grandes (≥ 8 mm de diâmetro) às 7 semanas pós parto não foi afectado quer pela CC, infusão com GnRH ou classe de folículo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos, por Rhind *et al.* (1992) que verificou que as concentrações de testosterona no fluído folicular não foram afectadas pela CC. No entanto, os resultados de Prado *et al.* (1990) *in vitro* mostraram que vacas em alta CC tiveram concentrações de testosterona mais elevadas do que vacas em baixa CC.

A quantidade de estradiol nos folículos é um factor importante da sua capacidade de resposta às gonadotrofinas e de conseguirem atingir os estágios finais de desenvolvimento e maturação (Gore-Langton e Armstrong, 1988). Neste estudo as concentrações de estradiol no fluído folicular de folículos ≥ 8 mm de diâmetro às 7 semanas pós parto não foi afectada quer pela CC ou pela infusão com GnRH. Contudo, a observação de que as concentrações de estradiol em vacas em alta CC foram superiores às das vacas em baixa CC é consistente com os resultados obtidos por Prado *et al.* (1990), nos quais a incidência de folículos altamente estrogénicos foi superior em vacas em alta CC quando comparada com vacas em baixa CC.

Pode-se pois concluir que a CC não afecta a capacidade do ovário em produzir folículos grandes, no entanto, parece que alguns desses folículos não têm a capacidade de produzir grandes quantidades de estradiol necessário para a ovulação. A reduzida produção de estradiol nos folículos não estrogénicos, particularmente em vacas em alta CC, sugere que estes folículos não tiveram a capacidade de converter os androgénios em estradiol, e isto não foi devido a uma falta de androgénios aromatizáveis pois eles foram idênticos em ambos os folículos estrogénicos e não estrogénicos.

A IGF-I está presente e é secretada pelo ovário (Hammond *et al.*, 1991; Spicer *et al.*, 1993) podendo exercer um efeito estimulante na esteroidogénese folicular das vacas (Savion *et al.*, 1981; McArdle e Holtorf, 1989). Neste estudo, as concentrações de IGF-I no fluído folicular foram semelhantes às concentrações encontradas por Echternkamp *et al.* (1990) em vacas de carne e não foram afectadas quer pela CC, quer pela infusão com GnRH.

D- Receptores Gonadotróficos

A conversão de androgénios (androstenediona e testosterona) em estradiol pelas células da granulosa é FSH dependente (Hansel e Convey, 1983), o que significa que a síntese de estradiol é dependente da existência de adequadas concentrações de receptores para a FSH nas células da granulosa. Como as células da teca secretam androgénios sob influência da LH (Gore-Langton e Armstrong, 1988) e a síntese de estradiol depende de um fornecimento adequado de um substrato de androgénios (Hansel e Convey, 1983) a presença de concentrações adequadas de receptores para a LH no tecido tecal é outro dos requisitos necessários para o normal desenvolvimento de um folículo.

Neste estudo não houve efeito quer da CC, quer da infusão com GnRH nas concentrações dos receptores para a LH em ambos os tecidos da teca e da granulosa. Contudo, houve uma diferença significativa na classe de folículos na qual os folículos estrogénico activos de vacas em alta CC, apresentaram um maior número de receptores para a LH do que os folículos não estrogénicos. As concentrações de receptores para a FSH nas células da granulosa não foram afectadas, quer pela CC, quer pela infusão com GnRH.

Este estudo mostra que às 7 semanas pós-parto, o número de receptores de FSH é idêntico em vacas com diferente CC e provavelmente não são responsáveis pelo aumento de produção de estradiol em vacas em alta CC. Os resultados de Rhind *et al.* (1992), tal como os resultados por nós obtidos neste estudo, mostram que não há diferenças nas concentrações de receptores de FSH com a CC.

Resumindo, parece pouco provável que as diferenças na produção de estradiol pelos folículos de vacas em diferente CC seja devido a diferenças nas concentrações de receptores gonadotróficos.

E- Número de Células da Granulosa

A capacidade dos folículos em produzir estradiol depende não só da produção de estradiol pelas células, mas também do número de células de granulosa existentes nos folículos grandes (Hillier, 1990).

Neste estudo o número de células da granulosa presentes em folículos ≥ 8 mm diâmetro às 7 semanas pós-parto, não foi afectado quer pela CC, quer pela infusão com GnRH. Ireland e Roche (1983b) em novilhas cíclicas e McNatty *et al.* (1984a) em vacas, observaram um número maior de células da granulosa do que aquele obtido por este estudo. No entanto, quando o número de células da granulosa é comparado com o número presente nos folículos estrogénico inactivos e folículos atresícos em novilhas, (Ireland e Roche, 1983b) este valor é idêntico. Ireland e Roche (1983a) sugerem que a perda de capacidade para produzir estradiol por um folículo estrogénicamente activo está associada à perda de células da granulosa e a uma redução no número de receptores de FSH e LH no tecido da teca e da granulosa.

O número de células da granulosa presentes às 7 semanas pós-parto, independentemente da CC, sugere que neste ponto do período do pós-parto os folículos ainda não se desenvolveram totalmente, pelo menos nos grupos AS e BS. A infusão com GnRH talvez tenha resultado num aumento adicional de células da granulosa nos folículos que subsequentemente ovularam. Contudo, os folículos presentes à ovariectomia, aparentemente, não foram suficientemente estimulados para que isto aconteça.

A existência de CL não funcionais (indicada pelos baixos níveis de progesterona) em duas vacas que ovularam no grupo BG, poderá ser devido ao baixo número de células da granulosa e conseqüentemente a uma baixa concentração de estradiol. Foi sugerido por Braden et al. (1984) que CL não funcionais poderão ocorrer em parte devido a alterações no desenvolvimento folicular.

5- CONCLUSÕES

Os resultados desta experiência apoiam a hipótese de que a infusão de pequenas doses de GnRH no pós-parto de vacas em baixa CC aumentaria o desenvolvimento folicular, indicado pelo facto de que 10 em 12 animais submetidos a infusão ovularam. Contudo, enquanto o tratamento com GnRH poderá ter ocasionado um aumento da produção de estradiol pelos folículos, este aumento foi inferior ao obtido pelo grupo de animais em alta CC; estes resultados não demonstram a verdadeira resposta dos ovários à infusão com GnRH pois as vacas do grupo BG tinham já ovulado e os folículos presentes na ovariectomia, estavam já num estado fisiológico diferente do que os dos grupos AS e BS. Se os folículos tivessem sido examinados antes da ovulação produções mais elevadas de estradiol poderiam ter sido observadas. A ocorrência de ovulação na maior parte dos animais tratados com GnRH, aliado ao facto de existir uma tendência para concentrações mais elevadas de estradiol nos folículos destes animais, sugere que o tratamento com GnRH foi capaz de estimular a esteroidogénese folicular. Contudo, as diferenças observadas entre grupos, aparentemente não podem ser atribuídas: a um aumento do número de células da granulosa, à capacidade da teca em sintetizar testosterona ou devido a diferenças na população de receptores para as gonadotrofinas.

AGRADECIMENTOS

Queremos agradecer à direcção do Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Scotland, todas as facilidades concedidas para a realização deste trabalho bem como aos membros do seu staff o apoio prestado durante a parte experimental. Queremos também agradecer ao Medical Research Center Edimburgo as análises efectuadas aos receptores gonadotróficos. Queremos ainda agradecer à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica a Bolsa concedida (BD/203/90), a qual permitiu a realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

BAIRD, D.T., SWANSTON, I.A. and McNEILLY, A.S., 1981. Relationship between LH, FSH and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol. of Reprod.*, 24: 1013-1025.

- BRADEN, T. D., KING, M. E., ODDE, K. G. and NISWENDER, G. D., 1989. Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. *J. Reprod. Fertil.*, 85: 97-104.
- BRAMLEY, T. A., STIRLING, D., SWANSTON, I. A., MENZIES, G. S. and BAIRD, D. T., 1987. Specific binding sites for LH/Chorionic gonadotropin, low-density lipoprotein, prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum. I: Validation of methods. *J. Endoc.*, 113: 305-315.
- BRUCE, L.A. ATKINSON, T., HUTCHINSON, J. S. M., SHAKESPEAR, R. A. and MACRAE, J. C., 1991. The measurement of insulin like growth factor I in sheep plasma. *J. Endoc.*, 128: R1-R4.
- CHAPPEL, S. C., 1985. Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone: a review. *Life Sci.*, 36: 97-103.
- CLARKE, I. J. and CUMMINS, J. T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endoc.*, 111: 1737-1739.
- CLARKE, I. J., BURMAN, K. I., DOUGHTON, B.W. and CUMMINS, J.T., 1986. Effects of constant infusion of gonadotrophin releasing hormone in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection: further evidence for differential control of LH and FSH secretion and the lack of a priming effect. *J. Endoc.*, 111: 43-49.
- CLARKE, I. J., CUMMINS, J. T. FINDLAY, J. K., BURMAN, K. J. and DOUGHTON, B.W., 1984. Effects on plasma luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone of varying the frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection. *Neuroendocrinology.*, 39: 214-221.
- DJAHANBAKHCH, O., SWANSTON, I. A., CORRIE, J. E. T. and McNEILLY, A. S., 1981. Prediction of ovulation by Progesterone. *Lancet*, 8256: 1164-1165.
- DORRINGTON, J. H., BENDELL, J. J., CHUMA, A. and LOBB, D. K., 1987. Actions of growth factors in the follicle. *J. Steroid Bioch.*, 27(1): 405-411.
- ECHTERNKAMP, S. E., FERREL, C. L. and RONE, J. D. (1982). Influence of pre and postpartum nutrition on LH secretion in suckled postpartum beef heifers. *Theriogenology.*, 18: 283-295.
- ECHTERNKAMP, S. E., SPICER, L. J., GREGORY, K. E., CHANNING, S. F. and HAMMOND, J. M., 1990. Concentrations of insulin like growth factor in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.*, 43: 8-14.
- GORE-LANGTON, R. E. and ARMSTRONG, D. T., 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, E. K. a. J. Neill. Raven Press New York, pp. 331-385.
- HAMMOND, J. M., MONDSCHHEIN, J. S., SAMARAS, S. E., SMITH, S. A. and HAGEN, D. R., 1991. The ovarian insulin-like growth factor system. *J. Reprod. Fertil., Sup.* 43:199-208.
- HANSEL, W. and CONVEY, E. M., 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 57 (2): 404-424.

- HILLIER, S.G., 1990. Ovarian manipulation with pure gonadotrophins. *J. Endoc.*, 127: 1-4.
- HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C., 1962. Preparation of labelled I^{131} using human Growth Hormone of high specific activity. *Nature*, 194: 495-496.
- IRELAND, J. J. and ROCHE, J. F., 1983a. Development of non-ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotrophins. *Endoc.*, 112: 150-156.
- IRELAND, J. L. and ROCHE, J. F., 1983b. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding in gonadotropins in follicle. *J. Anim. Sci.*, 59: 157-167.
- IRELAND, J. J., 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.*, Sup-34: 39-54.
- JAGGER, J. P., PETERS, A. R. and LAMMING, G. E., 1987. Hormone responses to low-dose GnRH treatment in postpartum beef cows. *J. Reprod. Fertil.*, 80: 263-269.
- KNOFF, L., KASTELIC, J. P., SCHALLENBERGER, E. and GINTHER, O. J., 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endoc.*, 6: 111-119.
- LOWMAN, B. G., SCOTT, N. A. and SOMMERVILLE, S. H., 1976. Condition scoring of cattle. *Review Edition Bulletin, E.S.C.A.*
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MCCARDLE, C. A. and HOLTORF, A. P., 1989. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: effects of insulin-like growth factor I, insulin and prostaglandins. *Endoc.*, 124 (3): 1278-1286.
- MCLEOD, B. J., PETERS, A. R., HARESIGN, W. and LAMMING, G. E., 1985. Plasma LH and FSH responses and ovarian activity in prepubertal heifers treated with repeated injections of low doses of GnRH for 72 h. *J. Reprod. Fertil.*, 74: 589-596.
- MCNATTY, K. P., HEATH, D. A., HENDERSON, K. M., LUN, S., HURST, P. R., ELLIS, L. M., MONTGOMERY, G. W., MORRISON, L. and THURLEY, D. C., 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 72: 39-53.
- MCCNEILLY, J. R., MCCNEILLY, A. S., WALTON, J. S. and CUNNINGHAM, F. J., 1976. Development and application of a heterologous radioimmunoassays for ovine follicle-stimulating hormone. *J. Endoc.*, 70: 69-79.
- MCCNEILLY, A. S., JONASSEN, J. A. and FRASER, H. M., 1986. Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 76: 481-490.
- MCCNEILLY, A.S. and FRASER, H.M., 1987. Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endoc.*, 115: 273-282.

- MOSS, G. E., PARFET, J. R., MARVIN, C. A., ALLRICH, R. D. and DIEKMAN, M. A., 1985. Pituitary concentrations of gonadotrophins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. *J. Anim. Sci.*, 60: 285-293.
- PETERS, A. R., LAMMING, G. E. and FISHER, M. W., 1981. A comparison of plasma LH concentrations in milked and suckling post-partum cows. *J. Reprod. Fertil.*, 62: 567-573.
- PRADO, R. D., 1989. Studies on ovarian follicles and endocrine status in postpartum beef cows varying in body condition. *M. Philosophy* University of Edinburgh.
- PRADO, R., RHIND, S. M., WRIGHT, I. A., RUSSEL, A. J. F., McMILLEN, S. R., SMITH, A. J. and McNEILLY, A. S., 1990. Ovarian follicle populations, steroidogenicity and micromorphology at 5 and 9 weeks postpartum in beef cows in two levels of body condition. *Anim. Prod.*, 5:1 103-108.
- REAY, P., 1982. Use of N-bromosuccinamide for the iodination of proteins for radioimmunoassay. *Annals of Clin. Bioch.*, 19: 129-133.
- RHIND, S. M., BRAMLEY, T. A., WRIGHT, I. A. and McMILLEN, S. R., 1992. FS hand LH receptor concentrations in large ovarian follicles of beef cows in high and low levels of body condition at nine weeks post partum. *Reprod. Fertil. and Devel.*, 4: 512-522.
- RILEY, G. M., PETERS, A. R. and LAMMING, G. E., 1981. Induction of pulsatile LH release, FSH release and ovulation in postpartum acyclic beef cows by repeated small doses of GnRH. *J. Reprod. Fertil.*, 63: 559-565.
- ROCHE, J. F., CROWE, M. A. and BOLAND, M. P., 1992. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 371-378.
- SAVION, N., LUI, G., LAHERTY, R. and GOSPODAROWICZ, D., 1981. Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endoc.*, 109: 409-420.
- SHORT, R. E., BELLOWS, R. A., STAIGMILLER, R. B., BERARDINELLI, J. G. and CUSTER, E. E., 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 68: 799-816.
- SPICER, L. J., ALPIZAR, E. and ECHTERNKAMP, S. E., 1993. Effects of Insulin, Insulin-Like Growth Factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production *In Vitro*. *J. Anim. Sci.*, 71: 1232-1241.
- SPICER, L. J., LEUNG, K., CONVEY, E. M., GUNTHER, J., SHORT, R. E. and TUCKER, H. A., 1986a. An ovulation in postpartum suckled beef cows. I - Associations among size and numbers of ovarian follicles, uterine involution and hormones in serum and follicular fluid. *J. Anim. Sci.*, 62: 734-741.
- SPICER, L. J., MATTON, P., ECHTERNKAMP, S. E., CONVEY, E. M. and TUCKER, H. A., 1987. Relationship between histological signs of atresia, steroids in follicular fluid and gonadotrophin binding in individual bovine antral follicles during postpartum anovulation. *Biol. Reprod.*, 36: 890-896.

- TERQUI, M., CHUPIN, D., GAUTHIER, D., PEREZ, N., PELOT, N. and MAULEON, P., 1982. Influence of management and nutrition on postpartum endocrine function and ovarian activity in cows. Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands.
- WALTERS, D. L., SHORT, R. E., CONVEY, E. M., STAIGMILLER, R. B., DUNN, T. G. and KALTENBACH, C.C., 1982. Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows. III. Induction of estrus, ovulation and luteal function with intermittent small-dose injections of GnRH. *Biol. Reprod.*, 26: 655-662.
- WEBB, R., BAXTER, G., MCBRIDE, D., NORDBLUM, G. D. and SHAW, M. P. K., 1985. The measurement of testosterone and oestradiol-17B using iodinated tracers and incorporating an affinity chromatography extraction procedure. *J. Steroid Bioch.*, 23: 1043-1051.
- WRIGHT, I. A., RHIND, S. M., RUSSEL, A. J. F., WHITE, T. K., MCBEAN, A. J. and MCMILLEN, S. R., 1987. Effects of body condition, food intake and temporary calf separation on the duration of the postpartum anoestrus period and associated LH and FSH and prolactin concentrations in beef cows. *Anim. Prod.*, 45: 395-402.
- WRIGHT, I. A., RHIND, S. M., WHITE, T. K., SMITH, A. J., MCMILLEN, S. R. and PRADO, R., 1990. Circulating concentrations of LH and FSH and pituitary responsiveness to GnRH in intact and ovariectomized suckled beef cows in two levels of body condition. *Anim. Prod.*, 51: 93-101.
- WRIGHT, I. A., RHIND, S. M. and WHYTE, T. K. (1992a). A note on the effects of pattern of food intake and body condition on the duration of the postpartum anoestrus period and LH profiles in beef cows. *Anim. Prod.*, 54: 143-146.
- WRIGHT, I. A., RHIND, S. M., WHYTE, T. K. and SMITH, A. J., 1992b. Effects of body condition at calving and feeding level after calving on LH profiles and the duration of the postpartum anoestrus period in beef cows. *Anim. Prod.*, 55: 41-46.