

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

INCIDÊNCIA DE ATRASO DE LUTEÓLISE EM VACAS HOLANDESAS
LACTANTES DE ALTA PRODUÇÃO

Ana Paula Oliveira Santos

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU- SP

Janeiro - 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

INCIDÊNCIA DE ATRASO DE LUTEÓLISE EM VACAS HOLANDESAS
LACTANTES DE ALTA PRODUÇÃO

ANA PAULA OLIVEIRA SANTOS
Zootecnista

Orientador: Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU- SP

Janeiro - 2020

S237i Santos, Ana Paula Oliveira

INCIDÊNCIA DE ATRASO DE LUTEÓLISE EM VACAS
HOLANDESAS LACTANTES DE ALTA PRODUÇÃO / Ana Paula
Oliveira Santos. -- Botucatu, 2020

52 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

1. Luteólise. 2. Corpo lúteo. 3. Bovinos de leite. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

Dedico aos animais experimentais que contribuem ao desenvolvimento da ciência.

“Não tente se tornar uma pessoa de sucesso, mas sim uma pessoa de valor”

(Albert Einstein).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por conduzir meus passos até aqui, devo todas as oportunidades de chegar onde cheguei ao Senhor. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas nem todas as mesmas oportunidades, então, muito obrigada por me escolher.

Aos meus queridos pais Moisés dos Santos e Nilza de Oliveira dos Santos, que me ensinaram desde cedo o valor do trabalho, com seus exemplos diários de esforço, dedicação e amor. Minha irmã Karina Oliveira Santos, pelo apoio e amizade. Meus tios Sidney Gabbai de Oliveira e Neusa Gabbai de Oliveira, pelo amparo e incentivo aos meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, vinculado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, pelo apoio acadêmico e a possibilidade de realizar um grande objetivo. À querida amiga e funcionária, Cláudia Cristina Moreci.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao meu orientador Professor Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos a orientação, a confiança e a amizade.

A University of Tennessee e Texas A&M pelo período de estágio de pesquisa.

Ao Professor Dr. Ky Garret Pohler e sua equipe, por me receberem em seu laboratório e pela ajuda com as análises.

Ao Dr. Marcos Henrique Colombo Pereira pela ajuda com as análises estatísticas e a imensa paciência.

Aos médicos veterinários Sérgio Soriano e Alex Sica, amigos, de grande importância pela ajuda na coleta de dados do experimento. Aos funcionários da Fazenda Colorado, em especial atenção para Mineiro, Luiz, Seu Luca, Marquinhos, Morivaldo, Rodolpho e Rodrigo. Em especial aos meus queridos amigos pela ajuda e suporte no decorrer desse mestrado Vanilda Luciene, Rafael Carvalho, João Paulo Lorenço, Tiago Leiva, Isabella Marconato, Tatiane Maia e Luísa Vecchia.

Aos componentes da banca Prof. Dr. Ronaldo Luis Aoki Cerri e Prof. Dr. Ky Garret Pohler, pelas valiosas sugestões.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Ana Paula Oliveira Santos, nascida no município de Botucatu- SP, em 19 de maio de 1992, filha de Moisés dos Santos e Nilza de Oliveira dos Santos. No ano de 2012 iniciou seus estudos no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Campus de Botucatu. Durante a graduação focou os estudos na área de produção de ruminantes, participou da Empresa Jr. NUTRIR na área de nutrição de ruminantes e do grupo de pesquisa em Integração Lavoura- Pecuária orientada pelo Prof. Dr. Ciniro Costa, no qual foi bolsista de iniciação científica pelo CNPQ. No final do ano de 2015 ao finalizar as disciplinas obrigatórias, ingressou no programa Intership Research pela University of British Columbia em Vancouver, Canadá; Participando do grupo de pesquisas na área de reprodução e bem- estar em gado leiteiro sob a orientação do Prof. Dr José Luiz Moraes Vasconcelos e supervisão do Prof. Dr. Ronaldo Luis Aoki Cerri, até novembro de 2016. No ano de 2017 ingressou no programa de mestrado em Zootecnia pela FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, no departamento de pós-graduação em produção animal, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos. Para realizar parte de suas pesquisas do mestrado, em fevereiro de 2018 mudou-se para a cidade de Knoxville, no Estado do Tennessee nos Estados Unidos, Department of Animal Science na University of Tennessee, e em maio mudou-se para a cidade de College Station, no Estado do Texas nos Estados Unidos, Department of Animal Science na Texas A&M University, sob a supervisão do Prof. Dr. Ky Garret Pohler.

Durante o mestrado trabalhou na área de reprodução, bem-estar e produção de vacas de leite. Tendo como trabalho para apresentação para obtenção do título de mestre intitulado como: Incidência de atraso de luteólise em vacas holandesas lactantes de alta produção.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
SUMÁRIO DE TABELAS	x
SÚMARIO DE FIGURAS	xi
Capítulo 1.....	1
Considerações Iniciais	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA:.....	4
1. Fisiologia do ciclo estral:	4
2. Luteólise	5
2.1 Doenças uterinas no atraso de luteólise	7
2.2 Piometra	8
3. PAG.....	8
4. Estresse Térmico	9
5. Monitores de Atividade.....	10
Referências Bibliográficas	12
Capítulo 2.....	23
RESUMO	24
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
1. Animais e Instalações.....	28
2. Delineamento Experimental.....	28
3. Temperatura vaginal.....	29
4. Ultrassonografia	30
5. Escore Uterino.....	30
6. Coletas de Sangue	30

7. Regressão do CL	31
8. Análise Estatística	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	37
IMPLICAÇÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de estradiol

CIDR - Dispositivo intravaginal de liberação de progesterona

CL - Corpo lúteo

DEL – Dias em lactação

ECC – Escore de condição corporal

E2 - Estradiol

ECC - Escore de condição corporal

ECP – Cipionato de estradiol

FSH - Hormônio folículo estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

IA - Inseminação artificial

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

IFNT - Interferon-tau

LH - Hormônio luteinizante

LPS – Lipopolissacarídeos

OT - Ocitocina

OTR – Receptores de ocitocina

P/IA – Prenhez por inseminação artificial

P4 - Progesterona

PAG – Glicoproteínas associadas a gestação

PGF - Prostaglandina

PGE2 – Prostaglandina E2

PGF2 α - Prostaglandina F2 α

PGFM – Prostaglandina Metabolizada

PLS – Produção média de leite

SPS- Escore de útero

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Apresenta a distribuição dos animais entre os tratamentos. Somente vacas que receberam o protocolo de sincronização e apresentaram estro entre os dias 10 e 11 do protocolo..... 33

Tabela 2. Resultado da porcentagem de vacas que regrediram o CL entre o d17 a d31, e a proporção de detecção de estro, somente vacas que não foram inseminadas e vacas inseminadas mas não gestantes foram incluídas nesta análise..... 34

Tabela 3. Resultado dos animais que foram divididos entre animais gestantes, animais inseminados (mas diagnosticados como não gestantes) e os animais do grupo controle, todos com presença de CL no dia 31. Foi realizada a proporção de animais com concentrações <1 ou >1 de P4 e PAGs..... 35

Tabela 4. Médias das concentrações de P4 e PAGs, referente ao resultado da proporção de animais de acordo com as classificações da tabela 03. Essa análise foi realizada apenas em vacas com CL no momento da coleta de sangue..... 36

SÚMARIO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de representação do experimento	29
Figura 2. Representação da influência da posição do trato reprodutivo no Tamanho e Posição Pontuação. Abreviaturas: colo do útero (C), pelve (P), trato reprodutivo (RT), aba pélvica (PB), tamanho e escore de posição (SPS).....	30

Capítulo 1

Considerações Iniciais

INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil desempenha importante papel econômico, o país é o quinto maior produtor de leite no mundo produzindo em 2018 um total de 22.659 toneladas de leite (USDA, 2019). O desempenho reprodutivo é diretamente responsável pela produção de leite, número de animais de reposição, melhoramento genético e taxa de descarte. Esses fatores justificam o investimento no desenvolvimento de tecnologias para aumentar a capacidade de obter maior número de vacas prenhes por IA. Devido a combinação de fatores como manejo, nutrição e seleção genética, ocorreu grande aumento na produção leiteira. Essa mudança para vacas mais produtivas está associada a diminuição na eficiência reprodutiva, pois animais com alta produção de leite apresentam maior incidência de infertilidade nos rebanhos, entretanto estudos epidemiológicos sugerem que além da produção de leite, outros fatores provavelmente estão diminuindo a eficiência reprodutiva em rebanhos leiteiros (LUCY, 2001). Portanto, muito cuidado deve-se ao concluir a relação de causa e efeito, entre o aumento da produção de leite e a redução no desempenho reprodutivo (LE BLANC, 2010).

A fisiologia reprodutiva das vacas leiteiras mudou nos últimos 50 anos, e adaptações fisiológicas à alta produção de leite podem explicar parte do declínio reprodutivo. As áreas críticas para novas pesquisas incluem o controle do ciclo estral, os efeitos metabólicos da lactação na reprodução, os mecanismos que ligam a doença à reprodução e a mortalidade embrionária precoce (LUCY, 2001)

O ciclo estral da vaca, dura em média, 21 dias, e esse ciclo é dividido em duas fases, uma marcada pela alta concentração de estrogênio (fase estrogênica) e outra pela progesterona (fase lútea). A fase lútea ocorre entre a ovulação e a luteólise, durando em média 17 dias. O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária que tem como principal função a secreção de progesterona (P4), responsável pela preparação do útero para o início e a manutenção da gestação (SIQUEIRA et al., 2009). Na ausência de um embrião viável, a prostaglandina (PGF2 α) é secretada pelo endométrio e desencadeia a luteólise.

Quando não ocorre devidamente o processo de luteólise, o animal pode vir a apresentar problemas em sua eficiência reprodutiva. A luteólise é desencadeada pela ocorrência de cinco a oito pulsos de PGF2 α liberados pelo endométrio durante um período de dois a três dias. No entanto, ainda não está totalmente esclarecida a maneira como se dá o controle da secreção de PGF2 α no início da luteólise; a hipótese mais provável é a de que a progesterona seja o principal estímulo para o aumento da secreção de PGF2 α . Sendo assim, os níveis de progesterona nos

primeiros dias do ciclo "programariam" o útero para a liberação PGF2 α . (REYNOLDS et al., 2000).

Os níveis de progesterona podem aumentar ou diminuir, de acordo com o nível de estresse térmico (agudo ou crônico) e do estado metabólico do animal. Estas alterações endócrinas reduzem a atividade folicular e alteram o mecanismo ovulatório, levando ao decréscimo na qualidade do oócito e do embrião, além de serem responsáveis pela manutenção da gestação (HANSEN, 2005). Dessa forma, baixas concentrações de progesterona na circulação de vacas podem comprometer a função reprodutiva e causar baixa fertilidade (THATCHER et al., 2001). Isso tem sido reportado pelo fato de se alterar a dinâmica folicular ovariana pela persistência do folículo dominante (WOLFENSON et al., 2002), o que induz mudanças na morfologia uterina e na secreção de PGF2 α (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001), reduzindo, a probabilidade de implantação do embrião (RENSIS E SCARAMUZZI, 2003). Vacas submetidas ao estresse calórico apresentaram aumento da duração da fase luteal, sendo esta, em média, nove dias maior que a observada em vacas alocadas em ambiente termoneutro, relacionando esse atraso da luteólise a uma possível relação negativa entre o estresse calórico e os mecanismos luteolíticos (WILSON et al. 1998).

Segundo JACKSON et al. (1997) A persistência de corpo lúteo também pode ocorrer devido à infecção que pode se instalar após a inseminação mal conduzida, na monta com touros infectados ou em vacas gestantes, nos casos de morte embrionária ou fetal. O corpo lúteo persistente perpetua a condição patológica, provavelmente por manter o útero sob a influência da progesterona, favorecendo a multiplicação de microrganismos ao reduzir a resistência do endométrio à infecção, o corpo lúteo torna-se persistente em virtude de o útero infectado não ter habilidade para produzir PGF2 α , fator luteolítico natural (revisado por FERREIRA et al., 2000).

O presente estudo teve por objetivo comparar a duração da fase lútea em vacas Holandesas em lactação e avaliar a regressão do corpo lúteo durante o período pós IA até o diagnóstico de gestação aos 31 dias, e com a hipótese de que, existe atraso de luteólise, independente da presença do embrião.

REVISÃO DE LITERATURA:

1. Fisiologia do ciclo estral:

Bovinos são poliestrais e exibem comportamento estral aproximadamente a cada 21 dias (FORDE et al., 2011). Este ciclo é dividido em duas fases, uma marcada pela alta concentração de estrógeno (fase estrogênica) e outra pela progesterona (fase lútea). A fase lútea ocorre entre a ovulação e a luteólise, durando em média 17 dias (SIQUEIRA et al., 2009).

Hormônios são produzidos para regular o ciclo estral através de um sistema de feedback positivo e negativo, sendo eles: do hipotálamo (hormônio liberador de gonadotrofina; GnRH), na hipófise anterior (hormônio folículo estimulante; FSH e hormônio luteinizante; LH), nos ovários (progesterona; P4, estradiol; E2 e inibinas) e no útero (prostaglandina F2 α ; PGF2 α) (FORDE, 2011). O aumento do FSH, que promove o crescimento e proliferação das células foliculares, inicia duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (ADAMS et al., 1992; SUNDERLAND et al., 1994) e cada onda é composta por: emergência de um grupo de folículos, seleção, dominância, atresia ou a ovulação do folículo dominante (FORDE et al., 2011).

A ovulação ocorre por volta de 30 horas (ROELOFS et al., 2005a) após o início do comportamento de estro, quando E2 promove feedback positivo no hipotálamo e na pituitária anterior, estimulando a liberação de GnRH e LH, e na maturação e ovulação do folículo dominante (ROCHE, 1996; WALKER et al., 1996). Após a ovulação, o LH intercede na formação do CL a partir das células da teca e da granulosa do folículo dominante ovulado (FORDE et al., 2011). O CL produz P4, que impede a ocorrência de pulsos frequentes de LH que resultariam na ovulação de um folículo dominante (SENGER et al., 2005).

O reconhecimento embrionário é sinalizado pela produção de interferon tau (IFNT) pelo concepto, o IFNT age inibindo a expressão de receptores de estrógeno e ocitocina evitando assim a liberação de pulsos de PGF2 α e consequentemente evitando a luteólise (ANTONIAZZI et al., 2011). Se o reconhecimento materno não for sinalizado, o que ocorre por volta do dia 16 do ciclo, ocorre a luteólise do CL (SENGER, 2005; FORDE et al., 2011). Com a regressão do CL, ocorre uma diminuição na concentração de P4, que resulta no aumento de GnRH permitindo assim, que o animal retome a uma nova emergência de onda folicular (SENGER, 2005; FORDE et al., 2011).

2. Luteólise

A luteólise é o processo em que o corpo lúteo (CL) sofre regressão, caracterizada inicialmente por diminuição na concentração plasmática de progesterona (P4). A fase lútea ocorre entre a ovulação e a luteólise, durando em média 17 dias. O CL é uma glândula endócrina temporária que tem como principal função a secreção de P4, responsável pela preparação do útero para o início e a manutenção da gestação (SIQUEIRA et al., 2009).

O CL é um órgão altamente vascularizado, o qual produz vários fatores angiogênicos. A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos por meio da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos preexistentes, e também está relacionada com o fluxo sanguíneo e a produção hormonal (revisado por MARTIN & FERREIRA, 2009). Entre os fatores angiogênicos, pode-se citar: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), angiopoetina (ANPT-1 e -2) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos e dispersão de P4; e entre os fatores vasoativos: endotelina-1 (EDN1), angiotensina II (Ang II) e o óxido nítrico (NO), responsáveis pelo fluxo sanguíneo (MIYAMOTO et al., 2009).

A $PGF2\alpha$ produzida no endométrio, alcança a circulação venosa uterina e, por meio de mecanismo contracorrente (que envolve transporte ativo), passa ao sistema arterial ovariano, onde produz vasoconstrição e, conseqüentemente, luteólise (revisado por TREVISOL et al., 2013).

Estudos realizados utilizando bovinos, traçando a relação entre a concentração plasmática de P4 e a secreção de $PGF2\alpha$ pelo endométrio no ciclo estral seguinte, foi constatado que uma baixa concentração de P4 resulta em alta secreção de $PGF2\alpha$ (SMITH et al. 2000). A luteólise é desencadeada pela ocorrência pulsos de $PGF2\alpha$ liberados pelo endométrio durante um período de 2 a 3 dias. A secreção de $PGF2\alpha$ é pulsátil, na razão de 3 a 4 pulsos por dia, tendo sido estabelecido que são necessários cerca de 5 pulsos para que ocorra luteólise completa. (NANCARROW et al., 1973; PETERSON et al, 1975; SMITH et al. 2000).

O corpo lúteo de bovinos possui receptores específicos para $PGF2\alpha$. A administração de $PGF2\alpha$ em novilhas na fase média do ciclo estral causa, de 4 a 12 horas após sua administração, diminuição significativa no mRNA luteínico da proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR), responsável pelo transporte de colesterol citoplasmático para o interior da mitocôndria (WAITE et al., 2005). A ligação da $PGF2\alpha$ a seus receptores na membrana das células luteais esteroideogênicas também estimula a atividade da proteína quinase C, que interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de

colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo retroalimentação negativa dos receptores de LH e, possivelmente, aumentando a expressão e a ativação das proteínas envolvidas nos processos de apoptose (BERTAN et al., 2006).

A ocitocina constitui um dos hormônios que determinam a luteólise em ruminantes. Estudos posteriores realizados em ovelhas e vacas mostraram que o gene para ocitocina era totalmente expresso no CL em desenvolvimento logo após a ovulação, confirmando, desse modo, que a síntese de ocitocina ocorria no CL de ruminantes (revisado por MCCRACKEN, 1999). Assim, a $PGF2\alpha$ estimula a secreção de ocitocina (OT) pelo CL e a ocitocina, por sua vez, estimula a secreção de $PGF2\alpha$ no útero. Esses dois hormônios compreendem um mecanismo de retroalimentação positiva que atua entre o útero e o CL para reforçar a regressão luteal. Contudo, existem evidências de que, no início da fase lútea, a ocitocina pode ser um importante fator luteotrópico (SHIRASUNA et al., 2007).

Próximo ao final da fase luteal, ocorre a inibição dos receptores de P4 na hipófise e endométrio permitindo a ação do E2, a luteólise tem início como resultado da elevação e ativação de receptores de estradiol, que induzem um aumento no número de receptores de ocitocina no endométrio. A participação do E2 na luteólise ocorre por duas maneiras: a primeira, por meio de estímulo hipotalâmico, que irá aumentar a frequência de pulsos de OT; a segunda, por estímulos endometriais, que irão aumentar a expressão de receptores para OT no E2 (MCCRACKEN et al., 1999).

A importância do E2 na regulação da luteólise foi considerada quando se observou que a remoção dos folículos ovarianos resultou em maior duração do ciclo estral e que a administração do E2 na metade da fase luteal eleva as concentrações plasmáticas de PGFM, dando início à luteólise, possivelmente pela elevação das concentrações de OTR endometriais. Esse efeito do E2 é dependente da P4, pois é observado somente após o endométrio ter sido previamente exposto à P4 (revisado por SÁ FILHO e VASCONCELOS, 2008).

A progesterona promove o acúmulo de ácido araquidônico (AA) e ciclooxigenase (COX) nas células endometriais, elementos essenciais à síntese de $PGF2\alpha$, porém a P4 exerce efeito supressivo à secreção de $PGF2\alpha$ até a segunda metade do ciclo estral, devido à ação inibitória da P4 na expressão do gene dos receptores de ocitocinas (SILVIA, 1991). Com a exposição contínua a P4, há uma redução nas concentrações dos receptores de P4, o bloqueio da P4 nos OTR se reduz e o endométrio passa a responder à OT secretando $PGF2\alpha$ (MCCRACKEN et al., 1999).

2.1 Doenças uterinas no atraso de luteólise

Mesmo quando expostos a semelhantes condições ambientais durante o periparto, alguns animais são capazes de combater a contaminação uterina rapidamente, enquanto outros desenvolvem diferentes graus de infecção uterina (WILLIAMS, 2005; HERATH, 2009; CHAPWANYA et al., 2009).

Cerca de 50% das vacas leiteiras têm ciclos ovarianos irregulares durante o período pós-parto, e animais com corrimento vaginal anormal são mais propensos do que os animais normais a atrasar a retomada dos ciclos ovarianos após o parto ou prolongar a fase luteínica no pós-parto. Em média, 40% das vacas mantidas em sistemas intensivos de produção de leite podem apresentar quadros de metrite nas três primeiras semanas após o parto, sendo que a doença uterina pode persistir na forma de endometrite em até 20% desses animais (SHELDON et al., 2009).

O início precoce da atividade ovariana facilita a involução uterina, no entanto, se a primeira ovulação ocorre na presença de um útero contaminado, isso pode levar ao desenvolvimento de uma piometra associada a um corpo lúteo persistente (OLSON, 1984; MARQUES E HORTA, 1987a; MATEUS et al., 2002), portanto ocorre a resolução dos processos infecciosos somente após a luteólise (LEWIS, 1997; SHELDON et al., 2006).

WILLIAMS et al., 2007 realizou um estudo em vacas Holandesas com infecção uterina aguda associada à presença de *E. coli* e *Trueperella pyogenes* aos sete dias após o parto, esses animais apresentam alterações nas funções ovarianas e menor crescimento folicular devido à diminuição da sensibilidade dos ovários ao FSH. O CL formado após a primeira ovulação em vacas com infecção uterina apresentam menor diâmetro e baixa capacidade de produzir progesterona devido à alteração das funções das células luteais promovida pelo LPS e outros componentes. (SHELDON et al., 2009). A endotoxina LPS é um lipopolissacarídeo presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, é responsável pela patogenicidade de determinados patótipos. Outros estudos, relatam que o LPS e citocinas pró-inflamatórias podem atingir a circulação sanguínea e suprimir a liberação de GnRH pelo hipotálamo e a secreção de LH pela hipófise. As consequências implicam em atraso no retorno da atividade ovariana luteal, maiores incidências de cistos ovarianos e prolongamento do período de anestro pós-parto (SHELDON et al., 2002a, 2009).

2.2 Piometra

A piometra ocorre quando o endométrio uterino contaminado por alta densidade de bactérias patogênicas (LEWIS et al., 2006), faz com que ocorra uma baixa na produção de prostaglandina (PGF2 α) que é um fator luteolítico natural, portanto não ocorrendo a luteólise do corpo lúteo (QUINN et al., 2005). Além disso, há liberação de prostaglandina E, ao qual auxiliará na inflamação, mantendo o CL persistente (SANTOS, NASCIMENTO e EDWARDS, 2010). Essa persistência do CL ocorre pela contínua produção de P4 ao qual ocasionará infecção intrauterina, levando a uma diminuição da contratilidade do miométrio, causando uma oclusão da cérvix e gerando um acúmulo de secreção endometrial (JONES, HUNT e KING, 2003). Segundo Foster et al., (2009) a oclusão da cérvix pode ou não ser completa.

Em quadros de piometra, a PGF2 α deve ser utilizada como tratamento, com o objetivo de promover a luteólise, induzir o estro, possibilitar o aumento natural da concentração de estrógeno e regular a função imunológica, resultando no aumento da capacidade do útero de combater a infecção (LEWIS, 1997; SHELDON, 2007).

3. PAG

As glicoproteínas associadas à gestação (PAGs) foram identificadas por três grupos de pesquisas independentes, explicando o processo de purificação dos extratos placentários bovinos e seu acúmulo no sangue materno (BUTLER, 1982; SASSER, 1986; ZOLI et al., 1992). Exibem uma série de padrões de expressão temporal e espacial pelos trofoblastos placentários e provavelmente representam um grupo de proteínas relacionadas que desempenham uma série de funções distintas nas formas sinepiteliocorial e epiteliocorial (WALLACE et al., 2015). São secretadas na circulação materna a partir de cerca de 24 dias de gestação, têm sido usada para diagnosticar prenhez em bovinos (SASSER et al., 1986; ZOLI et al., 1992; GREEN et al., 2005) e podem servir como um marcador da função placentária (PERRY et al., 2005; BREUKELMAN et al., 2012; POHLER et al., 2013).

As PAGs demonstraram ser uma ferramenta precisa para o diagnóstico da gestação em bovinos (POHLER et al., 2015) e vários ensaios comerciais estão disponíveis para a detecção de PAG no sangue e leite, por volta do dia 28 da gestação (LEBLANC et al., 2013; SILVA et al., 2007). Essas glicoproteínas podem ser utilizadas como biomarcadores da gestação e viabilidade embrionária, com uma precisão de 95 a 98% no diagnóstico de gestações entre os dias 28 e 30 de gestação, em vacas de leite e corte (SILVA et al., 2007; POHLER et al., 2013; OLIVEIRA FILHO et al., 2020).

Ambas as evidências experimentais e circunstanciais sugerem que PAGs podem afetar a função imunológica em bovinos. Por exemplo, o tratamento de PAG1 / PSPB bovino pode diminuir a proliferação de células hematopoiéticas (HOEBEN et al., 1999) e aumentar a liberação de proteína quimiotática de granulócitos 2 (GCP2) de células endometriais de bovino (AUSTIN et al., 1999). Se as PAGs possuem atividades imunomoduladoras ou imunossupressoras (DUNBAR et al., 1990, HOEBEN et al., 1999, 2000), elas podem estar contribuindo direta ou indiretamente para a supressão observada da função imune na época do parto.

Além das possíveis ações imunomoduladoras da PAG / PSPB, existem resultados experimentais que sugerem que a PAG / PSPB pode ter um papel luteotrófico em bovinos e ovinos. Por exemplo, o tratamento com PSPB de células luteais resultou num aumento de prostaglandina E2 mensurável (DEL VECCHIO et al. 1996, WEEMS et al., 1998a). A PGE2 possui ações luteotróficas e anti-luteolíticas em ruminantes. Pode-se esperar que uma proteína atuando como um composto luteotrófico cause um aumento na produção de progesterona a partir das células luteais.

4. Estresse Térmico

Cerca de dois terços do território brasileiro está localizada na região tropical onde há aumento na temperatura e na incidência de raios solares (AZEVEDO et al., 2005). Com isso, os animais desencadeiam respostas ao ambiente de estresse, adotando modificações fisiológicas e comportamentais no intuito de reduzir o efeito do calor (FERRO, 2011), como a diminuição da produção de calor metabólico ao reduzir a ingestão de alimentos (CHEN et al., 2013), dissipação do calor através da evaporação por meio do suor (OMINSKI et al., 2002; GEBREMEDHIN et al., 2008; TUCKER et al., 2008; SCHÜTZ et al., 2011) e aumento da frequência respiratória (MORAIS et al., 2008).

As respostas dos animais ao estresse térmico são fisiológicas e comportamentais, variando de espécie para espécie. A primeira resposta do animal é o aumento da atividade dos mecanismos para perda de calor (temperatura retal, frequência respiratória, temperatura do pelame), enquanto simultaneamente há redução nas funções de produção de calor (ingestão de alimentos e produção de leite) (BAËTA e SOUZA, 1997). Esse redirecionamento funcional determina vários prejuízos para as atividades produtivas dos animais, já que a manutenção da homeotermia é prioritária em relação as atividades como produção de leite e reprodução

(MARTELLO et al., 2004). MORRISON et al. (2000) relataram que a vaca leiteira começa a responder fisiologicamente a elevação da temperatura ambiente quando está acima de 22°C.

Os níveis de progesterona podem aumentar ou diminuir, de acordo com o nível de estresse térmico (agudo ou crônico) e do estado metabólico do animal. Estas alterações endócrinas reduzem a atividade folicular e alteram o mecanismo ovulatório, levando ao decréscimo na qualidade do oócito e do embrião, além de serem responsáveis pela manutenção da gestação (HANSEN, 2005). Dessa forma, baixas concentrações de progesterona na circulação de vacas podem comprometer a função reprodutiva e causar baixa fertilidade (THATCHER et al., 2001). Isso tem sido reportado pelo fato de se alterar a dinâmica folicular ovariana pela persistência do folículo dominante (WOLFENSON et al., 2002), o que induz mudanças na morfologia uterina e na secreção de prostaglandina (PGF2 α) (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001), reduzindo, assim, a probabilidade de implantação do embrião (RENSIS E SCARAMUZZI, 2003). Portanto, alterações na taxa do metabolismo associadas ao estresse calórico podem afetar o metabolismo da P4.

Vacas submetidas ao estresse calórico apresentaram aumento da duração da fase luteal, sendo esta, em média, nove dias maior que a observada em vacas alocadas em ambiente termoneutro, relacionando esse atraso da luteólise a uma possível relação negativa entre o estresse calórico e os mecanismos luteolíticos (WILSON et al. 1998).

5. Monitores de Atividade

Os sistemas de monitores de atividade são uma das principais ferramentas de detecção de estro utilizadas no mundo. Em algumas fazendas no Brasil, esse sistema de monitoramento já é o único meio de detecção de estro.

KIDDY et al., (1977) avaliou a média de variação na atividade física em vacas de leite utilizando pedômetros para humanos e descreveu que durante o estro ocorria um aumento de passos quatro vezes maior quando comparado ao período de não estro. Esse foi um dos primeiros estudos para o desenvolvimento dos sistemas de monitoramento de atividade para a detecção de estro.

Atualmente, estão disponíveis dois tipos de monitores: os pedômetros e acelerômetros. Os pedômetros medem o número de passos e acelerômetros medem a movimentação tridimensional, estimando a atividade geral do animal (FRICKE et al., 2014b). O Afimilk®, um pedômetro que é colocado nas pernas dos animais, mensura o número de passos por hora para a sessão de tempo mais recente, comparando com o valor médio dos 10 dias precedentes

ao período de referência (GALON, 2010). Este período de referência é incluído em um cálculo para a detecção do alarme de estro, definindo o aumento de atividade física associado com estro, é preciso um período basal de referência, para usá-lo como padrão na detecção do desvio padrão e o aumento relativo da atividade física do animal. Outros exemplos de monitores de atividade são: Heatime® (SCR Engineers, Natanya, Israel), ALPRO (DeLaval; Sweden), SmartDairy Activity (Boumatic, USA), IceTag (IceRobotics, UK).

Estudos mostram a eficiência dos monitores de atividade em detectar estro. A porcentagem detectada pelos monitores de atividade varia entre 51 e 90% tanto em sistema de confinamento quanto em sistema à pasto (LEWIS e NEWMAN, 1984; REDDEN et al., 1993; ROELOFS et al., 2005a; HOCKEY et al., 2009; KAMPHUIS et al., 2012; VALENZA et al., 2012; AUNGIER et al., 2015). MADUREIRA (2015) realizou um estudo com o objetivo de determinar os fatores de risco que afetam o aumento da atividade física durante o estro e a prenhez por inseminação de vacas leiteiras em lactação. Os animais foram monitorados continuamente por dois monitores automáticos de atividade (um acelerômetro montado em um colar [Heatime, SCR Engineers; HT] e um pedômetro colocado na perna [Boumatic Heat-seeker-TX; BO]). O valor preditivo positivo dos episódios de estro detectados pelos sistemas foram de 89,6% e 85,5%, respectivamente.

Referências Bibliográficas

ADAMS, G. P.; R. L. MATTERI, J. P.; KASTELIC, J.C.; KO, O.; GINTHER, J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94(1), p.177188, 1992.

ANTONIAZZI, A. Q. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural, Santa Maria**; v. 41, n. 1, p. 176185, 2011.

AUNGIER, S. P. M.; ROCHE, J. F.; DUFFY, P.; SCULLY, S.; CROWE, M. A. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the periestrus period in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-19, 2015.

AUSTIN, K. J.; KING, C. P.; VIERK, J. E.; SASSER, R. G.; HANSEN, T. R. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. **Endocrinology**; v.140, p. 542–545, 1999.

AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M.; LANA, A. M. Q.; SAMPAIO, I. B. M.; MONTEIRO, J. B. N.; MORATO, L. E. Estimation of Upper Critical Levels of the Temperature-Humidity Index for ½, 3 / 4 e 7 / 8 Lactating Holstein-Zebu Dairy Cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**; v.34, p.2000-2008, 2005.

BAÊTA, F.C.; SOUZA, C.F. *Ambiência em edificações rurais - conforto animal*. **Viçosa: UFV**; 246p., 1997.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**; v.43, p. 824-840, 2006.

BREUKELMAN, S. P.; PERENYI, Z.; TAVERNE, M. A.; JONKER, H.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; VOS, P. L.; DE RUIGH, L.; DIELEMAN, S. J.; BECKERS, J. F.; SZENCI,

O.Characterisation of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 concentrations. **The Veterinary Journal**; v. 194, p. 71–76, 2012.

BUTLER, J. E.; HAMILTON, W. C.; SASSER, R. G.; RUDER, C. A.; HASS, G. M.; WILLIAMS, R. J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. **Biology of Reproduction**; v. 26, p. 925-933, 1982.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L.; CALLANAN, J. J.; MEE, J.F.; O'FARRELLY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**; v. 71(9), p. 1396-407, 2009.

CHEN, J. M.; SCHUTZ, K. E.; TUCKER, C. B. Dairy cows use and prefer feed bunks fitted with sprinklers. **Journal of Dairy Science**; v. 96, p. 5035–5045, 2013.

DEL VECCHIO, R. P.; SUTHERLAND, W. D.; SASSER, R. G. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2 α . **Journal of Reproduction and Fertility**; v. 107, p. 131–136, 1996.

DUNBAR, M. M.; WONG T. S.; RUDER-MONTGOMERY, C. A.; CHEW, C. A.; SASSER, R. G. Partial characterization of the immunosuppressive properties of pregnancy-specific protein B (PSPB). **Theriogenology**; v. 33 (Suppl 1) 220, 1990.

FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M.; FERNANDES, C. A. C.; FREITAS C. Corpo lúteo persistente associado a infecções uterinas em rebanhos leiteiros da Zona da Mata-MG. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**; v. 7, n. 1, p. 25-28, jan./abr. 2000.

FERRO, D. A. C. Efeitos dos elementos climáticos na produção e reprodução de vacas leiteiras. **Dissertação, Universidade Federal de Goiás**; 2011.

FRICKE, P. M.; CARVALHO, P. D.; GIORDANO, J. O.; VALENZA, A.; LOPES, G. J.; AMUNDSON, M. C. Expression and detection of estrus in dairy cows: the role of new technologies. **The Animal Consortium 2014 (Supplements1)**; p. 134-143, 2014b.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**; v. 124(3-4), p. 163-169, 2011.

FOSTER, R. A. Sistema reprodutivo da fêmea. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Bases da Patologia em Veterinária. 4. ed., Rio de Janeiro: **Elsevier**; p. 1263-1316, 2009.

GALON, N. The use of pedometry for estrus detection in dairy cows in Israel. **Journal of Reproduction and Development**; v. 56, p. 48-52, 2010.

GEBREMEDHIN, K. G.; HILLMAN, P. E.; LEE, C. N.; COLLIER, R. J.; WILLARD, S. T.; ARTHINGTON, J. D.; BROWN-BRANDL, T. M. Sweating rates of dairy cows and beef heifers in hot conditions. **Transactions of the ASABE**; v.51, p. 2167-2178, 2008.

GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; AVALLE, M. P.; TELUGU, B. P.; MCLAIN, A. L.; PETERSON, A. J.; MCMILLAN, W.; MATHIALAGAN, N.; HOOK, R. R.; XIE, S.; ROBERTS, R. M. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. **Theriogenology**; v. 63, p. 1481-1503, 2005.

HANSEN, P.J. Managing the heat-stressed cow to improve reproduction. In: **Western Dairy Management Conference**, 7, 2005, Reno, NV. Proceedings... p.63-76. Disponível em: <<http://www.wdmc.org/2005/Hansen05.pdf>>. Acessado em: 28 dez. 2017.

HERATH, S.; LILLY, S. T.; FISCHER, D. P.; WILLIAMS, E. J.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2a to prostaglandin E2 in bovine endometrium. **Endocrinology**; v. 150, p.1912-1920, 2009.

HOCKEY, C.; MORTON, J.; NORMAN, S.; MCGOWAN, M. Evaluation of a neck mounted 2-hourly activity meter system for detecting cows about to ovulate in two paddock-based Australian dairy herds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. e107-e117, 2009.

HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; MASSART-LEEN, A.M.; LENJOU, M.; NIJS, G.; VAN BOCKSTAELE, D. In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**; v. 68, pp. 229-240, 1999.

HOEBEN, D.; MONFARDINI, E.; OPSOMER, G.; BURVENICH, C.; DOSOGNE, H.; DE KRUIF, A.; BECKERS, J.F. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. **Journal of Dairy Research**; v. 67(2), p. 249-59, 2000.

JACKSON, P. S. Treatment of chronic postpartum endometritis in cattle with cloprostenol. **Veterinary Record**; v. 101, n. 22, p. 441-443, 1977.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Patologia Veterinária. 6. ed. São Paulo: **Manole**; 1415 p., 2003.

KAMPHUIS, C.; DELARUE B.; BURKE C. R.; JAGO J. Field evaluation of 2 collar mounted activity meters for detecting cows in estrus on a large pasture-grazed dairy farm. **Journal of Dairy Science**; v. 95(6), p. 3045-3056, 2012.

KIDDY, C. A. Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 60, p. 235, 1977.

LEBLANC, S. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Development**; v. 56(S), p. S1-S7, 2010.

LEBLANC, S. J. Short communication: field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 96, p. 2345-2348, 2013.

LEWIS, G. S. Uterine health and disorders. **Journal of Dairy Science**; v. 80, p. 984-994, 1997.

LEWIS, G. S.; NEWMAN, E. S. K. Changes throughout estrous cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 67, p. 146-152, 1984.

LEWIS, G. S.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C. Prostaglandin F₂α upregulates uterine immune defenses in the presence of the immunosuppressive steroid progesterone. **American Journal of Reproductive Immunology**; v. 56(2), p. 102-11, 2006.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal Dairy Science**; v. 84(6), p. 1277-1293, 2001.

MARQUES, C. C.; HORTA, A. E. M. Onset of ovarian activity in the post-partum cow and its correlation with uterine involution. In World Veterinary Organisation (WVO) (eds), Proc XXVIII World Veterinary Congress, Montreal, Canada. **World Veterinary Foundation**; pp 118 (Abstr.), 1987a.

MADUREIRA, A. M. L.; SILPER, B. F.; POLSKY, L. B.; BURNETTE, T. A.; DRAGO FILHO, E. L.; SORIANO, S.; SICA, A. F.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A.. Effects of expression of estrus measured by activity monitors on ovarian dynamics and conception risk in Holstein cows. **Journal Dairy Science**; v. 98, p. 7003–7014, 2015.

MARTELLO, L. S.; SAVASTANO JR., H.; SILVA, S. L.; TITTO, E. A. L. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**; v.33, n.1, p.3-11, 2004.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**; v.16, n. 2, p. 270-279, 2009.

MATEUS, L.; COSTA, L. L.; BERNARDO, F.; SILVA, J. R. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. **Reproduction Domestic Animals**; v.37, p. 31-35, 2002.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrinemediated event. **Physiological Reviews**; v.79, p. 263–323. 1999.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**; v.6, p. 47-59, 2009.

MORAIS, D. A. E. F.; MAIA, A. S. C.; SILVA, R. G.; VASCONCELOS, A. M.; LIMA, P. O.; GUILHERMINO, M. M. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**; v. 37, p. 538-545, 2008.

MORRISON, D. G. Enhancing production and reproductive performance of heat-stressed dairy cattle. In: **Multistate Project S-299**; p.2-25, 2000.

NANCARROW, C. D.; BUCKMASTER, J.; CHAMELEY, W. Hormonal changes around oestrus in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**; v. 32, p. 320-321, 1973.

OLIVEIRA FILHO, R. V.; FRANCO, G. A.; REESE, S. T.; DANTAS, F.G; FONTES, P. L. P.; COOKE, R. F.; RHINEHART, J. D.; THOMPSON, K. W.; POHLER, K. G. Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle. **Theriogenology**; v.141, p 128-133, 2020.

OLSON, J. D.; BALL, L.; MORTIMER, R. G.; FARIN, P. W.; ADNEY, W. S.; HUFFMAN, E. M. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. **American Journal Veterinary Res**; v. 45, p. 2251–2255, 1984.

OMINSKI, K. H.; KENNEDY, A. D.; WITTENBERG, K. M.; MOSHTAGHI NIA, S. A. Physiological and production responses to feeding schedule in lactating dairy cows exposed to short-term, moderate heat stress. **Journal Dairy Science**; v.85, p. 730–737, 2002.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **The National Academy of Sciences of the USA**; v. 102, p. 5268–5273, 2005.

PETERSON, A. J.; FAIRCLOUGH, R. J.; PAYNE, E. Hormonal changes around bovine luteolysis. **Prostaglandins**; v. 10, p. 675-685. 1975.

POHLER, K. G.; GEARY, T. W.; JOHNSON, C. L.; ATKINS, J. A.; JINKS, E. M.; BUSCH, D. C.; GREEN, J. A.; MACNEIL, M. D.; SMITH, M. F. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. **Journal Animal Science**; v. 91, p. 4158–4167, 2013.

POHLER, K. G.; GREEN, J. A.; GEARY, T. W.; PERES, R. F. G.; PEREIRA, VASCONCELOS, J. L. M. Predicting embryo presence and viability. Regulation Implantation Establishment of Pregnancy Mammals. **Springer**; p. 253-270, 2015.

QUINN, P. J. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1. ed. Porto Alegre: **Artmed**; p. 512, 2005.

REDDEN, K. D.; KENNEDY, A. D.; INGALLS, J. R.; GILSON, T. L. Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. **Journal of Dairy Science**; v. 76, p. 713, 1993.

RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI J. R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**; v.6, p. 1139-1151, 2003.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**; v.12, p.1-9, 2000.

ROCHE, J. F. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**; v. 1(1), p. 19-27, 1996.

ROELOFS, J. B.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**; v. 64(8), p. 1690-1703, 2005a.

SÁ FILHO, O.; VASCONCELOS, J. L. M. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. **Revista Veterinária e Zootecnia**. v. 15, p. 220-233. 2008.

SANTOS, R. DE L.; NASCIMENTO, E. F.; EDWARDS, J. F. Sistema Reprodutor Feminino. In: SANTOS, R. de L.; ALESSI, A. C. Patologia Veterinária. 1. ed. São Paulo: **Roca**; p. 797-854, 2010.

SASSER, R. G.; RUDER, C. A.; IVANI, K. A.; BUTLER, J. E.; HAMILTON, W. C. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. **Biology of Reproduction**; v. 35, p. 936–942, 1986.

SCHUTZ, K. E.; ROGERS, A. R.; COX, N. R.; WEBSTER, J. R.; TUCKER, C. B. Dairy cattle prefer shade over sprinklers: Effects on behavior and physiology. **Journal Dairy Science**; v.94, p.273–283, 2011.

SENGER, P. L. Pathways to Pregnancy and Parturition. **2 Revised ed. Current Conceptions, Inc, Pullman, WA**, 2005.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone on bovine uterine prostaglandin F₂alpha secretion in the subsequent estrous cycle. **Reproduction**, v.122, p.643- 648, 2001.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; DOBSON, H. Effect of the regressing corpus luteum of pregnancy on ovarian folliculogenesis after parturition in cattle. **Biology of Reproduction**; v. 66, p.266–271, 2002a.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**; v. 65, p. 1516–1530, 2006.

SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C. W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**; v. 68, p. 549-559, 2007.

SHELDON, I. M.; PRICE, S. B.; CRONIN, J.; GILBERT, R. O.; GADSBY, J. E. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**; v.44, p.1-9, 2009.

SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, K.; NAGAI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F₂α during spontaneous luteolysis in the cow: A possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 965-970, 2007.

SILVA, E.; STERRY, R. A.; KOLB D.; MATHIALAGAN, N.; MCGRATH, M. F.; BALLAM, J. M. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**; v.90, p. 4612-4622, 2007.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKER, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON JR., L. Hormonal regulation of uterine secretion of PGF₂α during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**; v. 45, p.655-663. 1991.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. C. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrus cycle. **Animal Reproduction Science**; v. 115, p. 18-28, 2009.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**; v.69, p. 145–182. 2000.

SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**; v. 101(3), p. 547-555, 1994.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. P.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**; v.55, p.75-89. 2001.

TREVISOL, E.; FERREIRA, J. C. P.; ACKERMANN, C. L.; DESTRO, F. C.; AMARAL, J. B. Luteolysis in cattle: review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**; v.37, n.1, p.29-36, 2013.

TUCKER, C. B.; ROGERS, A. R.; SCHUTZ, K. E. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. **Applied Animal Behaviour Science**; v.109, p. 141–154, 2008.

United States Department of Agriculture – USDA. Market and Trade, custom query. Whashington: [s.n.], 2019. Available at: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Accessed at: 07 jun. 2019.

VALENZA, A.; GIORDANO, J. O.; LOPES, G.; VINCENTI, L.; AMUNDSON, M. C.; FRICKE, P. M. Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 95, p. 7115-7127, 2012.

WAITE, A. L.; HOLTAN, D. W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F₂alfa. **Domestic Animal Endocrinology**; v.28, p. 162-171. 2005.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; Mcgilliard, M. L. Time of Ovulation Relative to Mounting Activity in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**; v. 79(9), p. 1555-1561, 1996.

WALLACE, R. M.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F.; GREEN, J. A. Placental PAGs: Gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. **Reproduction**; v. 149, p. R115–R126, 2015.

WEEMS, Y. S.; LAMMOGLIA, M. A.; VERA-AVILA, H. R.; RANDEL, R. D.; SASSER, R. G.; WEEMS, C. W. Effects of luteinizing hormone (LH), PGE₂, 8-Epi-PGE₁, 8-Epi-PGF₂ α , trichosanthin and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of prostaglandin (PG) E (PGE) or F₂ α (PGF₂ α) in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 55, p. 359–376, 1998a.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; ENGLAND, G. C. W.; DOBSON, H.; PFEIFFER D. U.; SHELDON, I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. **Theriogenology**; v. 63, p. 102–117, 2005.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**; v. 68, p. 549–559, 2007.

WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effect of controlled heat stress on ovarian function in dairy cattle: I. Lactating cows. **Journal Dairy Science**; v.1, p. 2124 – 2131, 1998.

WOLFENSON, D.; SONEGO, H.; BLOCH, A.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; KAIM, Y.; MEIDAN, R. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**; v.22, p. 81- 90, 2002

ZOLI, A. P.; GUILBAULT, L. A.; DELAHAUT, P.; ORTIZ, W. B.; BECKERS J. F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. **Biology of Reproduction**; v. 46, p. 83–92, 1992

Capítulo 2

RESUMO

Incidência de atraso de luteólise em vacas holandesas lactantes de alta produção

O objetivo deste estudo foi comparar a duração da fase lútea em vacas Holandesas em lactação, que receberam inseminação artificial (IA) ou não (Controle). Vacas não gestantes (n= 1322) foram submetidas após o período de espera voluntário ao protocolo de sincronização de ovulação: um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR), 100 µg de GnRH e 2,0 mg de benzoato de estradiol em d-11, 25 mg de PGF em d -4, remoção do CIDR, 1,0 mg de cipionato de estradiol e PGF em d -2. As vacas foram aleatoriamente distribuídas no d 0 do protocolo para os tratamentos IA ou Controle. Somente vacas observadas em estro (n= 1124), detectadas por monitores de atividade foram incluídas no estudo. Para a análise de duração da fase lútea, apenas as vacas detectadas com corpo lúteo (CL) no d 17 e, posteriormente, não diagnosticadas gestantes foram incluídas na análise. Um mapa de cada vaca foi realizado para avaliar a presença de CL no d 17, 24 e 31. Foram coletadas amostras de sangue para os animais identificados com presença de CL nos dias 17, 24 e 31. Foi considerado como regressão do CL os animais que retornaram ao estro, os com ausência de CL ao exame de US, e os que apresentarem concentrações de P4 <1 ng/ml. Vacas que foram reinseminadas entre os dias 17 e 24 foram consideradas como tendo regressão luteal normal. Vacas que foram reinseminadas entre os dias 24 e 31 foram consideradas como regressão luteal tardia. Vacas com o mesmo CL nos respectivos dias (d 17, 24, 31) que não foram reinseminadas durante o período e não foram diagnosticadas como gestantes no dia 31 foram classificadas como tendo fase luteal longa. As concentrações séricas de PAG foram analisadas e utilizadas como marcadores de gestação e perda embrionária. O escore de condição corporal (ECC) e o escore de tamanho e posição do útero (SPS) foram determinados no d 0 e incluídos nas análises dos fatores de riscos associados à prenhez e à dinâmica do CL. Os dados binomiais foram analisados usando Proc Glimmix (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) com vaca como unidade de medida aleatória. Os modelos estatísticos incluíram tratamento, paridade, ECC, SPS e interações. As vacas em ambos os tratamentos foram distribuídas de maneira similar pela paridade (P=0,78). A prenhez por IA aos 31 e 60 dias no grupo IA foi de 21,0% e 17,2%, respectivamente. A porcentagem de detecção de estro foi de 48%. O tratamento não afetou a proporção de vacas com regressão de CL e nenhuma das variáveis explicativas foi significativa como fatores de risco para explicar a presença de fases luteínicas longas. Em conclusão, este estudo demonstrou que grande proporção (~ 60%) de vacas Holandesas em lactação não regrediram adequadamente o CL,

independente de ter recebido IA ou não e a estimativa de perda de gestação entre 24 e 31 dias foi de 18%.

Palavras- chave: Luteólise, corpo lúteo, bovinos de leite

ABSTRACT

Incidence of luteolysis delay in high-yielding lactating Holstein cows

The aim of this study was to compare the length of the luteal phase in lactating Holstein cows that which received to artificial insemination (AI) or not (Control). Non-pregnant cows (n=1322) were submitted after the voluntary waiting period to a synchronization protocol: An intravaginal progesterone device (CIDR), 100 ug of GnRH and 2.0 mg of estradiol benzoate on d -11, 25 mg of PGF on d -4, CIDR removal, 1.0 mg of estradiol cypionate and PGF on d -2. Cows were then randomly assigned at estrus (d 0) to the AI or the Control (sham) treatments. Only cows observed in estrus (n= 1124), detected by activity monitors were included in the study. For the analysis of length of luteal phase, only cows detected with a corpus luteum (CL) on d 17 and later not diagnosed pregnant were included in the analysis. A map of each individual cow was performance to evaluate the CL presence on d 17, 24 and 31. Blood samples were collect for animals identified with the presence of CL on the days 17, 24 and 31. It was considered as regression of CL, them returned to estrus, animals without CL on US examination, and those with P4 concentrations <1 ng / ml. Cows that were re-inseminated between days 17 and 24 were considered to have normal luteal regression. Cows that were rebreed between days 24 and 31 were considere as late luteal regression. Cows with the same CL on the respective days (d 17, 24 and 31) that were not rebreed during the period and were not diagnosed as pregnant on day 31 were classified as having a long luteal phase. Serum PAG concentrations were analyze and used as markers of pregnancy and embryonic loss. The body condition score (BCS) and a size and position score of the uterus (SPS) were measured at d 0 and included in the analyses of risk factors associated with pregnancy and CL dynamics. Binomial data was analyzed using proc glimmix of SAS with a cow how unit of aleatory measure. Statistical models included treatment, parity, BCS, SPS and interactions. Cows on both treatments were similarly distributed by parity (P=0.78). Pregnancy per AI at d 31 and 60 in the AI group was 21.0% and 17.2%, respectively. The frequency of estrus detected was 48%. Treatment did not affect the proportion of cows with a total regression of CL and none of the explanatory variables was significant as risk factors to explain the presence of long luteal phases. In conclusion, this study demonstrated that a large proportion (~ 60%) of lactating Holstein cows were failed to regression of the CL, regardless of whether they received AI or not and the estimated pregnancy loss betwenn 24 and 31 days was 18%.

Key words: Luteolysis, corpus luteum, dairy cow

INTRODUÇÃO

A fisiologia reprodutiva das vacas leiteiras mudou nos últimos 50 anos, com adaptações fisiológicas à maior produção de leite. As áreas críticas para novas pesquisas incluem o controle do ciclo estral, os efeitos metabólicos da lactação na reprodução, os mecanismos que ligam a doença à reprodução e a mortalidade embrionária precoce (LUCY, 2001).

O folículo pré-ovulatório no ovário é responsável pelas concentrações plasmáticas de estrógenos, condição determinante para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e a ovulação (BERTAN et al., 2006). Após a ovulação, as células da teca e as células da granulosa, que até então sintetizavam estrógenos, são reorganizadas para formarem o CL. O CL é uma glândula endócrina temporária, responsável pela produção de progesterona (DAVIS et al. 2003), com rápido crescimento, diferenciação e luteinização (LUIS E QUINTERO, 1998). Depois do desenvolvimento, o CL chega a fase estática de crescimento, no entanto, nesse período a concentração plasmática de P4 continua aumentando assim como o fluxo sanguíneo para o CL (BOLLWEIN et al. 2012). A P4 realiza diversas funções no sistema reprodutivo das fêmeas tais como: regular a duração do ciclo estral, promover o relaxamento do miométrio, estimular a proliferação de células endometriais e manter no útero as condições necessárias para o desenvolvimento do conceito (BERTAN et al., 2006). Na ausência de um embrião viável, a prostaglandina (PGF 2α) é secretada pelo endométrio e desencadeia a luteólise (SIQUEIRA et al., 2009).

Baixas concentrações de progesterona na circulação de vacas podem comprometer a função reprodutiva, alterando a dinâmica folicular ovariana pela persistência do folículo dominante (WOLFENSON et al., 2002), o que induz mudanças na morfologia uterina e na secreção de prostaglandina (PGF 2α) (SHAHAM-ALBALANCY et al., 2001), reduzindo, assim, a probabilidade de implantação do embrião (RENSIS e SCARAMUZZI et al., 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo animais neste experimento foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/FMVZ da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Número do protocolo: CEUA 0024/2018).

1. Animais e Instalações

Este experimento foi conduzido em uma fazenda comercial no estado de São Paulo/Brasil, no período de março a dezembro de 2017. Durante o período experimental todas vacas estavam alojadas em galpões free-stall em sistema de cross ventilation. Os animais possuíam livre acesso a água e eram alimentadas ad libitum com uma dieta à base de silagem de milho e feno de tifton como forragem, com concentrado à base de milho, farelo de soja, minerais e vitaminas também foram adicionados e balanceados para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas leiteiras segundo o NRC (2001).

Os animais foram alimentados e ordenhados três vezes ao dia, e todos os procedimentos relacionados ao estudo foram realizados com os animais contidos em canzins na linha de alimentação.

2. Delineamento Experimental

Foram utilizadas 1322 vacas da raça Holandesa lactantes, após o período de espera voluntário e sincronizadas com o seguinte protocolo de sincronização da ovulação: dispositivo de progesterona intravaginal contendo 1,9 g de progesterona (CIDR, Zoetis, São Paulo, Brasil), 100 µg de GnRH (Diacetato de gonadorelina, 2,0 mL de Cystorelin, Merial, SP, Brasil) e 2,0 mg (im) de benzoato de estradiol (BE, 2,0 ml de Gonadiol, Zoetis, São Paulo, Brasil) no dia -11, 25 mg de prostaglandina F2α (PGF, dinoprost trometamina, 5,0 ml de Lutalyse, Zoetis, Brasil) no dia -4, remoção de CIDR, 1,0 mg (im) de cipionato de estradiol (ECP, 0,5 mL de ECP, Zoetis, Brasil) e PGF no dia -2 conforme descrito por (Pereira et al., 2015).

Apenas vacas detectadas em estro pelos monitores de atividade (n= 1124) e com presença de CL no d17 (n= 1026) foram utilizadas neste estudo. A intensidade do estro foi avaliada com um acelerômetro (AfiMilk Pedometer Plus Tag, AfiMilk, Kibbutz Afikim, Israel) anexado a um dos membros posteriores na primeira semana pós-parto. Os dados foram transferidos para um banco de dados a cada 8 h em blocos de 2 h e mais tarde recuperados do AfiFarm Dairy Farm Management Software (AfiMilk, Kibbutz Afikim, Israel) e compilados

usando Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA). O comportamento de caminhada é registrado em uma base de 24 h e medida em três sessões de 8 h / d (00:00h a 07:59h, 08:00 a 15:59h, e 16:00h a 23:59h). Os passos de cio induzidos são calculados a partir dos passos médios / h da sessão de 8h com o maior valor das sessões de d 10 d 11, d 12. Os passos de linha de base / h foram os passos médios das sessões de d 0, d 1, d 2. Sendo assim, o sistema gera um alerta de alta atividade ao sistema quando evidenciado a variação na unidade de passos médios basais do animal.

No dia 0, os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos dois grupos:

- Não IA (n= 225) – as vacas não foram inseminadas no d 0
- IA (n= 801) - as vacas foram inseminadas no d 0

No início do protocolo para sincronização de estro foram realizadas as classificações dos animais para escore de condição corporal (escala de 1 a 5 em incrementos de 0,25) (WILDMAN et. al, 1982), os tratos uterinos foram classificados em uma escala de 1 a 3, de acordo com tamanho e posição (YOUNG, et. al., 2017). Foram coletadas as informações individuais dos animais em relação a lactação, produção de leite dos últimos 10 dias, dias do último cio, e número de inseminações anteriores (Afimilk Pedometer Plus Tag, AfiMilk, Kibbutz Afikim, Israel) que foram registrados no início do protocolo de sincronização.

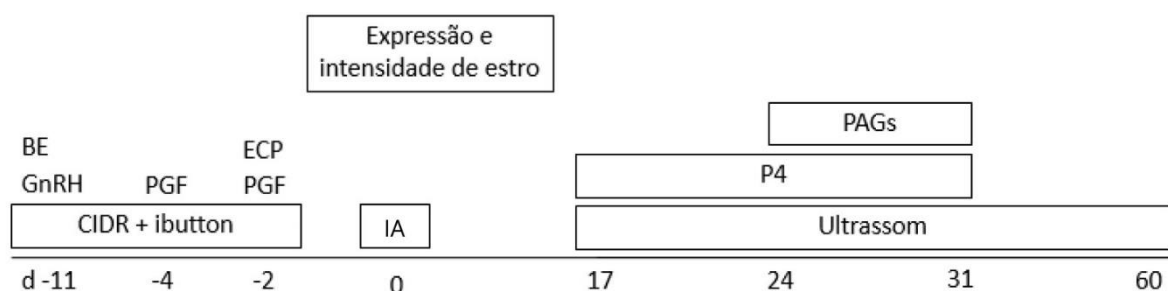


Figura 1. Diagrama de representação do experimento

3. Temperatura vaginal

A temperatura vaginal das vacas foi monitorada utilizando termômetros (Thermochron iButton - 40 °C a + 85 °C), acoplados ao CIDR do protocolo de IA, de forma a que o sensor tivesse contato com a mucosa da parede vaginal. A temperatura foi aferida a cada 10 minutos. Após a retirada dos termômetros a coleta e exportação dos dados foram feitas pelo dispositivo One wire Viewer x64 DS9490.

Segundo VASCONCELOS et al., 2011 animais submetidos ao estresse térmico apresentam temperatura corporal acima de 39,1°C, portanto, foi avaliado a porcentagem de tempo em que os animais estiveram com a temperatura $\geq 39,1^\circ\text{C}$.

4. Ultrassonografia

Os ovários foram examinados por ultrassonografia transretal utilizando um aparelho de ultrassom (Honda HS-101V + Transdutor Linear Retal) para determinar a presença de CL. As vacas foram avaliadas no início do protocolo e nos dias 17, 24 e 31. O corpo lúteo foi avaliado para determinar a regressão do CL e os diagnósticos de prenhez foram realizados nos dias 31 e 60.

5. Escore Uterino

Os tratos uterinos foram avaliados durante o início do protocolo de IA, os tratos uterinos foram examinados durante a palpação retal (e atribuídas em uma escala SPS de 1 a 3, de acordo com tamanho e posição).

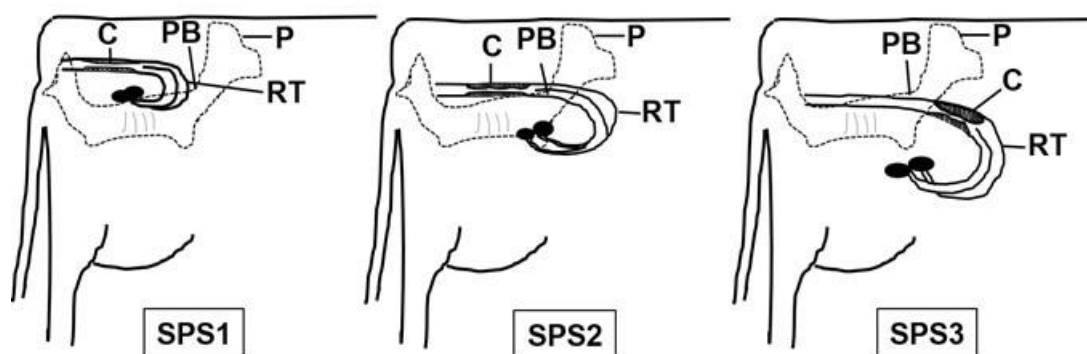


Figura 2. Representação da influência da posição do trato reprodutivo no Tamanho e Posição Pontuação. Abreviaturas: colo do útero (C), pelve (P), trato reprodutivo (RT), aba pélvica (PB), tamanho e escore de posição (SPS).

Os tratos reprodutivos posicionados inteiramente dentro da cavidade pélvica representam um SPS 1. Traços reprodutivos em que o colo do útero está dentro da cavidade pélvica, mas os cornos uterinos estão fora da cavidade pélvica representam um SPS 2. Os traços reprodutivos em que o colo do útero e os cornos uterinos se encontram fora da cavidade pélvica representam SPS 3 (YOUNG et. al., 2017)

6. Coletas de Sangue

As amostras de sangue foram coletadas em d 17, 24 e 31, pela veia coccígea em tubos de coleta de sangue comerciais de 10 mL (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ,

EUA). Após as colheitas, os tubos foram colocados em gelo imediatamente, mantidos a 4 ° C durante 12 h, e centrifugados a 1.500 g durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 - 25°C) para a coleta de soro. O plasma armazenado a -20 ° C para as análises de P4 e PAGs.

As concentrações séricas de P4 foram analisadas utilizando o kit de fase sólida Coat-A-Count radioimunoensaio 125I (DPC Diagnostic Products Inc., Los Angeles, CA).

A concentração sérica de PAG foram analisadas usando um kit de ensaio ELISA protocolo “in house” estabelecido por (GREEN et al.,2005) e modificado usando um anticorpo policlonal (Ab 63) como descrito anteriormente por (REESE et al., 2018; REESE et al.,2019).

Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram inferiores a 10% para todos os ensaios.

7. Regressão do CL

Na análise de duração da fase lútea, apenas as vacas detectadas com CL no d 17 e não diagnosticadas gestantes foram incluídas na análise. Foi considerado como regressão do CL os animais que retornaram ao estro, os com ausência de CL e os que apresentarem concentrações de P4 <1 ng/ml. Segundo GINTHER et al., (2010) luteólise é definida pela diminuição da concentração de P4 abaixo de 1ng/ml.

Um mapa de cada vaca foi realizado para avaliar a presença de CL no d 17, 24 e 31 e determinar o momento da regressão do CL. Vacas que foram reinseminadas entre os dias 17 e 24 foram classificadas como tendo regressão luteal normal. Vacas que foram reinseminadas entre os dias 24 e 31 foram consideradas como regressão luteal tardia. Vacas com o mesmo CL nos respectivos dias (d 17, 24, 31), que não foram reinseminadas durante o período e não foram diagnosticadas como gestantes no dia 31 foram classificadas como tendo fase luteal longa.

8. Análise Estatística

Variáveis binomias (presença ou ausência de CL no dias -11, 17, 24 e 31, prenhez por IA, % de regressão de CL e expressão de estro) foram analisadas com o procedimento GLIMMIX do SAS (SAS ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo inicial contém as seguintes variáveis como efeitos fixos: tratamento (IA ou não IA), paridade (primípara x múltipara), produção de leite, ECC, presença de CL no d -11, escore de útero e dias em lactação), bem como interação com estas variáveis. Efeitos fixos com $P > 0,15$ foram removidos por processo de eliminação stepwise backward, onde apenas $P \leq 0,15$ foi mantido no modelo.

Diferenças na circulação de P4 e PAG nos dias 17, 24 e 31 foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo continha tratamento, paridade e o resultado da intereção.

Diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$ e tendências quando $P > 0,05$ e $P \leq 0,10$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a duração da fase lútea. O número total de animais avaliados foi de 1322, sendo removidos 198 animais que não apresentaram estro no monitor de atividades após o protocolo e 98 animais que não apresentaram CL no dia 17 totalizando 1026 animais.

Tabela 1. Distribuição dos animais que apresentaram estro no protocolo entre os tratamentos

	Tratamento		P=
	Controle	IA	
ECC	3,06 ±0,02	3,03 ± 0,01	0,38
SPS	1,74 ±0,04	1,75 ±0,02	0,87
PLS	43,2 ± 0,65	4,1 ± 0,36	0,14
DEL	124 ± 4,4	124 ± 2,4	0,92
Paridade	2,08 ± 0,07	2,04 ± 0,04	0,57
Primiparas	39,4% (97/246)	40,4% (350/866)	0,78
Multiparas	60,6% (149/246)	59,6% (516/866)	0,78
Presença de CL			
CL d -11	57,8 (141/246)	57,5 (504/878)	0,94
CL d 17	91,5 (225/246)	91,2 (801/866)	0,91
% T em estresse (>39,1)	34,7 (79/85)	33,9 (298/310)	0,79
% T em estresse (>39,5)	12,8 (61/85)	12,3(107/310)	0,84

Controle: Animais protocolados, porém não inseminados; IA: Animais protocolados e inseminados; ECC: Escore de condição corporal; SPS: Escore de útero; PLS: Produção média de leite; DEL: Dias em lactação; % T em estresse >39,1: Porcentagem de tempo em que os animais estiveram com a temperatura superior a 39,1 °C; % T em estresse >39,5: Porcentagem de tempo em que os animais estiveram com a temperatura superior a 39,5 °C.

Não houve diferença na distribuição dos animais entre os tratamentos de acordo com as variáveis analisadas EEC, SPS, PLS, DEL, paridade, presença de CL d-11, presença de CL no d17 e a porcentagem de tempo a cima das temperaturas de 39,1 °C e 39,5°C.

No presente estudo aproximadamente 43% dos animais não possuíam CL no d-11. Segundo STEVENSON et al. (2008) aproximadamente 30% das vacas pós-parto não possuem

CL quando o protocolo de sincronização é iniciado. Esses animais quando submetidos aos protocolos de IATF, reduzem a concentração de P4 circulante durante o desenvolvimento folicular (SOUZA et al., 2008, BISINOTTO et al., 2010a, BISINOTTO et al., 2013), resultando em redução na P/IA (BISINOTTO et al., 2010a, BISINOTTO et al., 2010b).

Em média os animais passaram 34% do tempo com a temperatura igual ou superior 39,1 °C, e não houve diferença entre os tratamentos. Os efeitos negativos do estresse térmico na P/IA estão associados a efeitos negativos na competência oocitária (RISPOLI et al., 2013) fertilização (HACKBART et al., 2010), desenvolvimento embrionário precoce (WOLFENSON et al., 2000, HANSEN et al., 2001) e desenvolvimento embrionário após d7 (DEMETRIO et al., 2007). Está bem estabelecido que o estresse térmico pode reduzir a P/IA em vacas em lactação (VASCONCELOS et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2011a, VASCONCELOS et al., 2011c).

A distribuição do momento da regressão do CL entre o d17 a d31 e a proporção de detecção de estro até o d31 estão descritos na tabela 02. Não houve diferença entre os tratamentos no momento da regressão do CL total (d17 a d31) (P=0,99). A porcentagem de vacas detectadas em estro ou inseminadas até o d 31 também não foi diferente entre os grupos (P=0,25).

Tabela 2. Momento da regressão do corpo lúteo no grupo controle vs animais inseminados e diagnosticados como vazios, e a proporção de detecção de estro até o d31.

	Tratamento		P=
	Controle	IA P-	
Momento regressão			
d17 a d24	38% (85/225)	40% (215/535)	0,54
d24 a d31	16% (37/225)	16% (84/535)	0,80
>31	46% (103/225)	44% (236/535)	0,67
Detecção de estro			
d17 a d24	34% (29/85)	43% (93/215)	0,14
d24 a d31	70% (26/37)	44% (37/84)	<0,01

* somente vacas que não foram inseminadas e vacas inseminadas mas não gestantes foram incluídas nesta análise.

O tratamento não afetou a proporção de vacas com regressão de CL, independente do momento avaliado. De forma surpreendente, aproximadamente 40% dos animais apresentaram, regressão do CL dentro do momento adequado, entre 17 e 24 dias. O atraso da regressão do CL

afeta de maneira negativa os índices reprodutivos do rebanho, pois menos animais tem chance de apresentarem estro e serem novamente inseminados. Além disso, ao avaliar a taxa de detecção de estro, observa-se que foi menor no grupo que recebeu IA, o que pode ser devido a perda de gestação.

Na tabela 3 os animais foram divididos entre animais gestantes, animais inseminados (mas diagnosticados como não gestantes pelo US) e os animais do grupo controle, todos com presença de CL no dia 31. Foi realizada a proporção de animais com concentrações <1ng/mL ou >1 ng/mL de P4 e PAGs.

Tabela 3. Resultado da proporção de animais de acordo com a classificação das concentrações <1 ng/mL ou >1 ng/mL de P4 e PAGs.

	Tratamento		
	IA P+	IA P -	Controle
P4			
<1 ng/mL	2,3% (6/264)	13,4% (31/232)	16,7% (17/102)
>1 ng/mL	97,7% (258/264)	90,5% (201/232)	83,3% (85/102)
P=	<0,01	<0,01	<0,01
PAGs			
<1 ng/mL	7,60% (20/263)	73,3% (165/225)	94,8% (92/97)
>1 ng/mL	92,4% (243/263)	26,7% (60/225)	5,2% (5/97)
P=	<0,01	<0,01	<0,01

* somente animais com presença de CL no d31; IA P+: animais diagnosticados como gestante no US; IA P-: animais diagnosticados como vazios no US; Controle: animais que não receberam inseminação.

Os resultados da proporção de vacas de acordo com as classificações de P4, sugerem que as concentrações de P4 não devem ser utilizadas como indicadores de gestação ou perda embrionária. No grupo de animais gestantes, ao analisar apenas a concentração de P4 observa-se 2,3% de falso negativo. Se considerarmos animais com P4 > que 1 ng/mL, observa-se entre 83 e 90% de falso positivos. Com relação as concentrações de PAGs, observa-se 7,6% de falso negativos em animais gestantes e 26,7% de falso positivos em animais inseminados e não gestantes, e em animais não inseminados 5,2%. A diferença nestes dois grupos pode ser devido a perda de gestação entre os dias 24 e 31. A estimativa de perda de gestação entre 24 e 31 dias considerando as vacas com PAGs acima de ng/mL como gestantes foi de 18,6% (60/263+60)

Segundo Pohler et al., (2016) vacas gestantes no dia 31 aumentam a PAG circulante a partir do dia 24 de gestação em comparação com vacas não gestantes. No d31 vacas gestantes tem o valor preditivo de 1 ng/ml comparadas a vacas não gestantes (POHLER et al., 2013; POHLER et al.,2016; REESE et al.,2018; REESE et al.,2019).

Na tabela 04 estão as médias das concentrações de P4 e PAGs, referente ao resultado da proporção de animais de acordo com as classificações da tabela 03. Essa análise foi realizada apenas em vacas com CL no momento da coleta de sangue.

Tabela 4. Concentração média de P4 e PAG no d31, referente a proporção de animais classificados com P4 e PAG <1 ng/mL e >1ng/mL no d31, por tratamento.

Tratamento				
	IAP+	IA P-	Controle	P=
Média P4 d31				
P4 <1 ng/mL	0,42 ± 0,14 (n=6)	0,35 ± 0,06 (n=31)	0,36 ± 0,08 (n=17)	0,89
P4 >1 ng/mL	5,55 ± 0,14a (n=258)	4,88 ± 0,15b (n=201)	4,28 ± 0,24c (n=85)	<0,01
P=	<0,01	<0,01	<0,01	
Média PAG d31				
P4 <1 ng/mL	0,91 ± 0,29xa (n=6)	0,32 ± 0,12y (n=31)	0,06 ± 0,16b (n=17)	0,05
P4>1 ng/mL	5,43 ± 0,18a (n=258)	1,65 ± 0,21b (n=201)	0,19 ± 0,33c (n=85)	<0,01
P=	<0,01	<0,01	0,19	
Tratamento				
	IAP+	IA P-	CONTROLE	P=
Média P4 d31				
PAG <1 ng/mL	4,60 ± 0,52 (n=20)	3,72 ± 0,18 (n=165)	3,57 ± 0,25 (n=92)	0,21
PAG >1 ng/mL	5,51 ± 0,15 (n=243)	5,56 ± 0,29 (n=60)	4,65 ± 1,0 (n=5)	0,52
P=	0,09	<0,01	0,42	
Média PAG d31				
PAG <1 ng/mL	0,50 ± 0,05a (n=20)	0,16 ± 0,018b (n=165)	0,10 ± 0,02c (n=92)	<0,01
PAG >1 ng/mL	5,74 ± 0,21a (n=243)	5,08 ± 0,43a (n=60)	1,43 ± 1,48b (n=5)	<0,01
P=	<0,01	<0,01	<0,01	

* somente animais com presença de CL no d31; IA P+: animais diagnosticados como gestante no US; IA P-: animais diagnosticados como vazios no US; Controle: animais que não receberam inseminação.

Houve diferença nas médias das concentrações de P4 >1 ng/mL no d31 entre os tratamentos, vacas gestantes apresentaram concentrações de P4 superiores quando comparadas a vacas vazias e ao grupo controle, esses resultados sugerem que ocorreu morte embrionária precoce no grupo de vacas inseminadas e vazias. A P4 pode influenciar a secreção uterina de nutrientes e fatores de crescimento que são essenciais para o início do desenvolvimento

embrionário (MANN e LAMMING et al., 2001), pois a P4 controla o ambiente uterino e influencia o desenvolvimento embrionário (MANN e LAMMING, 2001; GREEN, 2005; MANN et al., 2006), portanto concentrações mais baixas de P4 após a IA podem reduzir o desenvolvimento embrionário e a taxa de sobrevivência (MANN e LAMMING, 2001; GREEN et al., 2005). Também pode-se criar a hipótese de que o embrião pode estar associado a este aumento nas concentrações de progesterona, ao sinalizar a sua presença prolongando a vida do CL, garantindo a produção continuada de P4 (BAZER et al., 2008). As médias das concentrações de PAG no d 31 foram distintas em ambos os tratamentos, os animais gestantes apresentaram maiores concentrações circulantes de PAGs no d31 do que as vacas inseminadas mas diagnosticadas como não gestantes (IA P-) e o grupo controle. Entretanto, o grupo IA P- apresentou média de concentração superior ao grupo controle, isso se deve a hipótese de que estaria ocorrendo perda embrionária neste grupo, e estes resultados sugerem que as concentrações de PAG no d31 podem prever gestação e perdas embrionárias entre o d24 e d31.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que existe atraso na luteólise (~60%) e que a estimativa de perda de gestação entre 24 e 31 dias foi de 18%.

IMPLICAÇÕES

Os resultados desta pesquisa mostraram que existe atraso na luteólise e que isto pode interferir na eficiência reprodutiva por diminuir a taxa de detecção de cio de retorno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 3, p. 179-211, 2008.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**; v. 43, p. 824-840. 2006

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 93 n.8, p. 3578-3587, 2010

BISINOTTO, R. S., RIBEIRO, S. E.; MARTINS, L. T.; MARSOLA, R. S.; GRECO, L. F.; FAVORETO, G.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **Journal of Dairy Science**; v. 93, p. 5798-5808, 2010b.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; MARTINEZ, N.; GRECO, L. F.; BARBOSA, L. F.; BUENO, P. P.; SCAGION, L. F.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**; v. 96, n.4, p 2214-2225, 2013.

BOLLWEIN, H.; LÜTTGENAU, J.; HERZOG, K. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. **Reproduction, Fertility and Development**; v. 25, n. 1, p. 71-79, 2012.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; SPANEL- BOROWSKI, K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**; v. 1, n. 1, p. 1-15, 2003.

DEMETRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G.; VASCONCELOS, J. L. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**; v. 90, n. 11, p 5073-5082, 2007.

GINTHER, O. J.; SHRESHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; SHAHIDUZZAMAN, A. K. M.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite os prostaglandina F2a and circulating concentrartions of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. **Theriogenology**; v74, 1179-1186, 2010.

GREEN, M. P.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on d 5 of pregnancy in dairy cows. **Animal Reproduction Science**; v. 88, p. 179- 189, 2005.

GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; AVALLE, M. P.; TELUGU, B. P., MCLAIN, A. L.; PETERSON, A. J. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. **Theriogenology**, v.63, p. 1481-1503, 2005.

HACKBART, K. S.; FERREIRA, R. M.; DIETSCH, A.A.; SOCHA, M. T.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. Effect of dietary organic zinc, manganese, copper, and cobalt supplementation on milk production, follicular growth, embryo quality, and tissue mineral concentrations in dairy cows. **Journal of Animals Science**; v. 88, n. 12, p. 3856-3870, 2010.

HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; ALKATANANI, Y. M.; KRININGER, C.E.; CHASE, C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**; v. 55, n. 1, p 91-103, 2001.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**; v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001.

LUIS, J. H. C.; QUINTERO, A. Z. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. **Ciências Veterinária**; v.8, p. 128, 1998.

MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 500-503, 2006.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

NRC 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. No. 7. **National Academy Press**, Washington, DC.

PEREIRA, M. H.; WILTBANK, M. C.; BARBOSA, L. F.; COSTA, W. M.; CARVALHO, M. A.; VASCONCELOS J. L. M. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin $f2\alpha$ treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. **Journal of Dairy Science**; v. 98, n.2, p. 947-959, 2015.

POHLER, K. G.; GEARY, T. W.; JOHNSON, C. L.; ATKINS, J. A.; JINKS, E. M.; BUSCH, D. C.; GREEN, J. A.; MACNEIL, M. D.; SMITH, M. F. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. **Journal Animal Science**; v. 91, p. 4158–4167, 2013.

POHLER, K. G.; PEREIRA, M.; LOPES, F.; LAWRENCE, J.; KEISLER, D.; SMITH, M. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. **Journal Dairy Science**; v. 99, p. 1584-1594, 2016.

REESE, S. T.; PEREIRA, M. H. C., EDWARDS, J. L., VASCONCELOS, J. L. M., POHLER, K. G. Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. **Theriogenology**, v.106, p. 178-185, 2018.

REESE, S. T.; GEARY, T. W.; FRANCO, G. A.; MORAES, J. G. N.; SPENCER, T. E.; POHLER, K. G. Pregnancy associated glycoproteins and pregnancy loss in high vs sub fertility heifers. **Theriogenology**, v.135, p. 7-12, 2019.

RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, J.R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, v.6, p.1139-1151, 2003.

RISPOLI, L. A., PAYTON, R. R; GONDRO, C.; SAXTON, A. M.; NAGLE, K. A.; JENKINS, B. W.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J. L. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**; v. 146, n. 2, p. 193-207, 2013.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone on bovine uterine prostaglandin F₂alpha secretion in the subsequent estrous cycle. **Reproduction**, v.122, p. 643- 648, 2001.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. C. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrus cycle. **Animal of Reproduction Science**; v. 115, p. 18-28, 2009.

SOUZA, A. H.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; WILTBANK, M. C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**; v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

STEVENSON, J. S.; TENHOUSE, D. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C.; LARSON, J.E.; DAHLEN, C.R.; PURSLEY, J. R.; BELLO, N. M.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C.; BRUSVEEN, D. J.; BURKHART, M.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 7, p 2901-2915, 2008.

VASCONCELOS, J. L. M.; DEMÉTRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; CHIARI, J. R.; RODRIGUES, C. A.; SÁ FILHO, O. G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p 192-200, 2006.

VASCONCELOS, J. L. M.; COOKE, R. F.; JARDINA, D. T. G.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S.; SOBREIRA, N.; SCARPA, A. B. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. **Animal Reproduction Science**; v. 127, n. 3–4, p. 140–147, 2011.

VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO, O. G.; JUSTOLIN, P. L.; MORELLI, P.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p 223-234, 2011c.

YOUNG, C.; SCHRICK, F. N.; POHLER, K. G.; SAXTON, A.; CROCE, F. D.; ROPER, D.; WILKERSON, J.; EDWARDS, J. L. A reproductive tract scoring system to manage fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**; v. 100, n. 7, p 5922-5927.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairybody condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982

WOLFENSON, D.; ROTH Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heatstressed cattle: basic and applied aspects. **Animals Reproduction Science**; v. 60-61, p. 535-547, 2000.

WOLFENSON, D.; SONEGO, H.; BLOCH, A.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; KAIM, Y.; MEIDAN, R. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 81- 90, 2002.