



EDER PEREIRA CAMPOS DRUMOND RODRIGUES

**IMPACTO DA DOENÇA UTERINA CLÍNICA PÓS-PARTO
SOBRE A BIOMETRIA E ATIVIDADE OVARIANA DE
VACAS LEITEIRAS**

**LAVRAS-MG
2024**

EDER PEREIRA CAMPOS DRUMOND RODRIGUES

**IMPACTO DA DOENÇA UTERINA CLÍNICA PÓS-PARTO SOBRE A BIOMETRIA
E ATIVIDADE OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS**

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

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Orientador

**LAVRAS - MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rodrigues, Eder Pereira Campos Drumond.

Impacto da doença uterina clínica pós-parto sobre a biometria e atividade ovariana de vacas leiteiras / Eder Pereira Campos Drumond Rodrigues. - 2024.

72 p. : il.

Orientador(a): Miller Pereira Palhão.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Medicina Veterinária. 2. Reprodução Animal. 3. Bovinocultura de leite. I. Palhão, Miller Pereira. II. Título.

EDER PEREIRA CAMPOS DRUMOND RODRIGUES

**IMPACTO DA DOENÇA UTERINA CLÍNICA PÓS-PARTO SOBRE A BIOMETRIA
E ATIVIDADE OVARIANA DE VACAS LEITEIRAS**

**IMPACT OF CLINICAL POSTPARTUM UTERINE DISEASE ON BIOMETRY AND
OVARIAN ACTIVITY IN DAIRY COWS**

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

APROVADA em 20 de Fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

UNIFENAS

Prof. Dr. José Camisão de Souza

DZO – UFLA

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Orientador

**LAVRAS - MG
2024**

*A Deus que me fortalece todos os dias, ao meu
esposo, aos meus pais e aos meus irmãos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de me permitir almejar o título de mestre, me concedendo força e persistência para alcançar os meus objetivos e metas.

Ao meu esposo e companheiro que está sempre do meu lado me apoiando e aconselhando e aos meus pais que foram os grandes pilares da minha formação.

Agradeço o imenso apoio e os conselhos dos meus irmãos durante este ciclo.

À professora Nadja Gomes Alves por ter me amparado e acolhido nesta nova casa, a Universidade Federal de Lavras. Agradeço imensamente pelo suporte!

Aos meus mentores de estudo e conselheiros de vida, aos professores Bárbara Azevedo Pereira Torres e João Bosco Barreto Filho.

Ao meu orientador, professor Miller Pereira Palhão, sempre disposto a ensinar e ajudar a encarar novos desafios profissionais.

Ao grupo de estudo Gestar por ter sido parte fundamental na minha preparação durante a pós-graduação.

Aos funcionários da fazenda Palmital e aos membros do Grupo do leite e do UFLA leite por serem prestativos e me acompanharem durante a execução do experimento.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem na conclusão deste trabalho.

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

E finalmente, à Universidade Federal de Lavras que me permitiu a elaboração e a conquista deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi associar o impacto da doença uterina clínica pós-parto sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana de vacas leiteiras em dois momentos, aos 21 e aos 45 dias após parto. O experimento foi conduzido na fazenda Palmital da Universidade Federal de Lavras. Foram acompanhadas 34 vacas híginas desde 14 dias antes da data prevista de parto, D-14, até o quinto dia após o período de espera voluntária da fazenda, D45. Na data do parto, D0, foram registradas as informações zootécnicas. Os animais foram examinados clinicamente por meio das aferições: peso corporal, escore de condição corporal (ECC), temperatura retal (TR), postura e locomoção (P/L), grau de desidratação (GD) por volta dos D-14, D7, D21 e D45. Do D3 ao D10, foi avaliada e fixada em maior *escore*, a característica da descarga vaginal com o uso do dispositivo Metrichcek®. Exames reprodutivos foram realizados por meio de ultrassom veterinário Mindray® acoplado a um transdutor retal de 7,5 MHz, em dois períodos: D21 e D45. Foram elaborados vídeos de sete segundos de cada ovário nos dois momentos, com a finalidade de obter e permitir cálculos dos dados ovarianos, como: proporção de ocorrência de corpo lúteo (CL), volumes de CL e de folículo dominante (FD), contagem de folículos antrais (CFA) e biometrias ovarianas. As variáveis foram analisadas estatisticamente pelo *software* SAS®. No D10, as vacas foram categorizadas por meio das variáveis clínicas como TR, P/L e GD associadas ao *escore* de descarga vaginal, em dois grupos experimentais: ausência de doença reprodutiva (ADR), definido por animais que não manifestaram: alterações ao parto, sinais clínicos e corrimento vaginal, ou tiveram muco com consistência “gelatinosa”, não fétido; e doença uterina clínica pós-parto (DUC), determinado pela presença de sinais clínicos associados ao corrimento vaginal purulento branco amarelado podendo conter raias de sangue ou muco fino, seroso ou aquoso, marrom-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico, e fétido. Foi observado maior redução de ECC durante o estudo para os animais do grupo DUC em comparação aos do grupo ADR. Como resultados, obteve-se maior proporção de animais com CL, maiores volumes de CL e FD, bem como maiores biometrias ovarianas para as vacas do grupo ADR em relação às do grupo DUC. No tocante às primíparas, teve-se menor proporção com CL, menores volumes de CL e FD, bem como menores biometrias ovarianas em comparação às multíparas. A idade dos animais exibiu efeito sobre a CFA e as biometrias ovarianas. Além disso, foi observado no D21 que os volumes ovarianos foram maiores para multíparas com ausências de doenças reprodutivas (ADR-M) em comparação às multíparas com doenças uterinas clínicas pós-parto (DUC-M), ($p < 0,05$). Entretanto, no D45, as biometrias ovarianas não diferiram entre os grupos ADR-M e DUC-M, ($p = 0,41$). Portanto, o estudo demonstrou que a doença uterina clínica pós-parto impactou de forma negativa sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana de vacas leiteiras, somente aos 21 dias pós-parto.

Palavras-chave: metrite; exame clínico; dimensões ovarianas; reprodução; produção de leite.

ABSTRACT

The objective of this study was to associate the impact of postpartum clinical uterine disease on biometry and the reestablishment of ovarian cyclic activity in dairy cows at two time moments, 21 and 45 days after parturition. The experiment was conducted at the Palmital farm of the Federal University of Lavras. Thirty-four healthy cows were monitored from 14 days before the expected parturition date, D-14, until the fifth day after the farm's voluntary waiting period, D45. On the parturition date, D0, zootechnical information was recorded. The animals were clinically examined by measuring: body weight, body condition score (BCS), rectal temperature (RT), posture and locomotion (P/L), and degree of dehydration (DD) around D-14, D7, D21, and D45. From D3 to D10, the vaginal discharge characteristic was evaluated and assigned a higher score using the Metrichcek® device. Reproductive examinations were performed using a Mindray® veterinary ultrasound coupled to a 7.5 MHz rectal transducer, in two periods: D21 and D45. Seven-second videos of each ovary were produced at both moments, in order to obtain and allow calculations of ovarian data, such as: proportion of occurrence of corpus luteum (CL), CL and dominant follicle (DF) volumes, antral follicle count (AFC) and ovarian biometrics. The variables were statistically analyzed using SAS® software. On D10, cows were categorized by clinical variables such as RT, P/L and DD associated with the vaginal discharge score, into two experimental groups: absence of reproductive disease (ARD), defined by animals that did not manifest: alterations at parturition, clinical signs and vaginal discharge, or had mucus with a “gelatinous” consistency, non-fetid; and clinical postpartum uterine disease (CUD), determined by the presence of clinical signs associated with purulent, yellowish-white vaginal discharge that may contain streaks of blood or thin, serous or watery mucus, reddish-brown, with or without parts of necrotic tissue, and fetid. A greater reduction in ECC was observed during the study for animals in the CUD group compared to those in the ARD group. As a result, a greater proportion of animals with CL, larger CL and DF volumes, as well as larger ovarian biometrics were obtained for cows in the ARD group compared to those in the CUD group. Regarding primiparous cows, there was a lower proportion of CL, lower CL and DF volumes, as well as lower ovarian biometrics compared to multiparous cows. The age of the animals showed an effect on AFC and ovarian biometrics. In addition, it was observed on D21 that ovarian volumes were higher for multiparous cows with no reproductive diseases (M-ARD) compared to multiparous cows with clinical postpartum uterine diseases (M-CUD), ($p < 0.05$). However, on D45, ovarian biometrics did not differ between the M-ARD and M-CUD groups, ($p = 0.41$). Therefore, the study demonstrated that clinical postpartum uterine disease had a negative impact on biometrics and the reestablishment of ovarian cyclic activity in dairy cows, only at 21 days postpartum.

Keywords: metritis; clinical examination; ovarian dimensions; reproduction; production.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

O trabalho apresenta impactos em potenciais nas áreas sociais, tecnológicos, econômicos e culturais. Em primeiro lugar, busca entender a gravidade do processo inflamatório/infeccioso, e em seguida entrar com tratamento específico de modo a preservar recursos para o produtor de leite e a sociedade, melhorando saúde e bem-estar dos animais, além de estabelecer uso eficiente de medicamentos. Em segundo lugar, procura trazer avanços científicos e/ou tecnológicos por meio da experimentação, além de incentivar pesquisas nas áreas correlatas, pois as doenças uterinas clínicas causam intensos prejuízos econômicos, produtivos e reprodutivos. Por fim, em terceiro, permite estabelecer novos conceitos, informações, capacitações e tecnologias. O objetivo da pesquisa intitulada “Impacto da doença uterina clínica pós-parto sobre a biometria e atividade ovariana de vacas leiteiras” foi associar o efeito da doença uterina clínica pós-parto sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade ovariana de vacas leiteiras em dois momentos, aos 21 e aos 45 dias após parto. No tocante a metodologia, foi destacada a integração entre pessoas e o uso de ferramentas tecnológicas e inovadoras no diagnóstico das doenças reprodutivas, bem como a utilização de cálculos matemáticos e *softwares* sobre estruturas biológicas, como os ovários. Acredita-se que o trabalho alcançará produtores de leite, colaboradores e profissionais, além de graduandos e pós-graduandos, especialistas, mestres, doutores e pós-doutores. Espera-se que as publicações decorrentes da pesquisa gerem impactos nacionais e internacionais. Os resultados da pesquisa foram satisfatórios conforme a hipótese definida e contou com orientações e sugestões de docentes, discentes de graduação e pós-graduação, além de alunos do ensino médio, bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Científica Júnior. A área de tecnologia e produção foi a mais relevante no contexto da Política Nacional de Extensão. A erradicação da fome e a promoção da agricultura sustentável, o trabalho decente e o crescimento econômico, o consumo e a produção responsáveis, a vida terrestre, bem como a promoção da paz, da justiça e das instituições eficazes, foram os propósitos mais marcantes dentre os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) para que o Brasil cumpra a Agenda 2030. Portanto, o estudo demonstrou que a doença uterina clínica pós-parto impactou de forma negativa sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana de vacas leiteiras, somente aos 21 dias após o parto. Diante disso, a pesquisa cumpre de forma eficaz e eficiente seu objetivo principal.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

The study has potential impacts in the social, technological, economic and cultural areas. First, it seeks to understand the severity of the inflammatory/infectious process, and then introduce specific treatment in order to preserve resources for the dairy producer and society, improving the health and welfare of animals, in addition to establishing efficient use of medications. Second, it seeks to bring scientific and/or technological advances through experimentation, in addition to encouraging research in related areas, since clinical uterine diseases cause intense economic, productive and reproductive losses. Finally, third, it allows the establishment of new concepts, information, training and technologies. The objective of the research entitled “Impact of postpartum clinical uterine disease on biometry and ovarian activity of dairy cows” was to associate the effect of postpartum clinical uterine disease on biometrics and the reestablishment of ovarian activity in dairy cows at two moments, 21 and 45 days after parturition. Regarding the methodology, the integration between people and the use of technological and innovative tools in the diagnosis of reproductive diseases were highlighted, as well as the use of mathematical calculations and software on biological structures, such as the ovaries. It is believed that the work will reach milk producers, collaborators and professionals, as well as undergraduate and graduate students, specialists, masters, doctors and post-doctors. It is expected that the publications resulting from the research will generate national and international impact. The results of the research were satisfactory according to the defined hypothesis and included guidance and suggestions from professors, undergraduate and graduate students, as well as high school students, Scientific Initiation and Junior Scientific Initiation scholarship holders. The area of technology and production was the most relevant in the context of the Política Nacional de Extensão. The eradication of hunger and the promotion of sustainable agriculture, decent work and economic growth, responsible consumption and production, life on land, as well as the promotion of peace, justice and effective institutions, were the most striking purposes among the 17 Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations (UN) for Brazil to comply with the 2030 Agenda. The study demonstrated that postpartum clinical uterine disease had a negative impact on the biometrics and reestablishment of ovarian cyclic activity in dairy cows, only 21 days after postpartum. Therefore, the research effectively and efficiently fulfills its main objective.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido(s)
ADR	Ausência(s) de doença(s) reprodutiva(s)
AO	Área ovariana
AOC	Área ovariana corrigida
AMH	Hormônio anti-müllerano
BE	Benzoato de estradiol
BHB	Beta-hidroxibutirato
BEPN	Balço energético e proteico negativo
c	Comprimento
CE	Cipionato de estradiol
CFA	Contagem de folículos antrais
CL	Corpo(s) lúteo(s)
D	Dia
DEL	Dias em lactação
DP	Desvio padrão
DUC	Doença(s) uterina(s) clínica(s) pós-parto
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EDV	Escore de descarga vaginal
ESU	Escore de <i>status</i> uterino
FD	Folículo(s) dominante(s)
GD	Grau de desidratação
GH	Hormônio do crescimento (somatotropina)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Altura
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IM	Intramuscular
l	Largura
LH	Hormônio luteinizante
MEC	Matriz extracelular
NEFA	Ácido(s) graxo(s) não esterificado(s)
P4	Progesterona
PC	Peso corporal
PEV	Período de espera voluntária
PGF2 α	Prostaglandina F 2-alfa
P/L	Postura e locomoção
TMR	Total mixed ration (ração total)
TR	Temperatura retal
UI	Unidades internacionais
VO	Volume ovariano
VOA	Volume ovariano ajustado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Período de transição	16
2.2 Balanço Energético e Proteico Negativo.....	17
2.3 Estresse térmico	18
2.4 Doenças uterinas	18
2.5 Dinâmica folicular pós-parto.....	19
2.6 Primeira ovulação pós-parto	20
2.7 Parênquima ovariano.....	21
2.8 Estroma ovariano	22
2.9 Contagem de folículos antrais.....	28
2.10 Medidas ovarianas	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Descrição do local e manejo dos animais	30
3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais	30
3.3 Desenho experimental.....	31
3.4 Dados clínicos	32
3.5 Dados ovarianos	33
3.6 Definições e cálculos dos volumes ovarianos.....	34
3.7 Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Animais excluídos.....	36
4.2 Coletas de dados.....	36
4.3 Quadro clínico dos animais.....	36
4.4 Escore de descarga vaginal e <i>status</i> uterino.....	41
4.5 Retomada da atividade ovariana	43
4.6 Contagem de folículos antrais.....	45
4.7 Biometrias ovarianas.....	47
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho experimental - as vacas foram examinadas clinicamente nos D-14, D7, D21 e D45. No D10 foram classificadas em dois grupos experimentais: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC). A avaliação e a fixação do *escore* da descarga vaginal foi realizada com o uso do Metrichcek® entre o D3 e o D10 após o parto. Os exames ultrassonográficos (US) foram realizados em D21 e D45. O protocolo hormonal indicado para iniciar no D40 após o parto visa inseminar os animais no D51. O sinal de \pm indica que os dias foram aproximados. 31
- Figura 2.** Diagrama representando a técnica de rotação da sonda ultrassônica 90° ao redor do ovário para obter medidas em três dimensões: c (cm; comprimento), h (cm; altura) e l (cm; largura). A h foi determinante para a obtenção da l, assim, ao girar a sonda, a mensuração da “nova h” deveria ser semelhante à encontrada em conjunto com o c..... 35
- Figura 3.** Médias \pm desvios padrões das temperaturas retais avaliadas por meio de termômetro digital em relação às quatro aferições: pré-parto, 1^a, 2^a e 3^a pós-parto. *** indica que houve diferenças entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e e doença uterina clínica pós-parto (DUC), $p < 0,01$ 38
- Figura 4.** Médias \pm desvios padrões dos escores de condição corporal avaliados segundo Ferguson et al., (1994), a respeito das quatro aferições: pré-parto, 1^a, 2^a e 3^a pós-parto. ** e *** apontam diferenças entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC). Todos os dados foram aferidos por único operador. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 39
- Figura 5.** Proporções de animais que apresentaram postura e locomoção (P/L) classificada como “boa” ou “adequada”, de acordo com avaliação visual realizada por um único operador, acerca das quatro aferições: pré-parto, 1^a, 2^a e 3^a pós-parto. *** sugere que houve diferenças e * indica tendência entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), *** $p < 0,01$ e * $0,05 \leq p \leq 0,10$ 40
- Figura 6.** Painéis A, B e C - proporções de animais que exibiram grau de desidratação (GD) classificado como “normal” ou “sem desidratação”, “leve” e “grave”, respectivamente, de acordo com o turgor cutâneo e avaliação visual da endoftalmia, analisados por um único operador, sobre as quatro aferições: pré-parto, 1^a, 2^a e 3^a pós-parto. *** e ** indicam que houve

diferenças e * infere tendência entre os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ e * $0,05 \leq p \leq 0,10$ 41

Figura 7. Painéis A e B – médias \pm desvios padrões dos escores de descarga vaginal (EDV) conforme adaptação de Machado et al. (2020) e dos escores de status uterino (ESU), respectivamente. Os escores foram avaliados por um único operador. O EDV foi mensurado entre os D3 e D10 pós-parto e fixado em maior valor averiguado, enquanto o ESU foi analisado por exame ultrassonográfico auxiliado por palpação retal aproximadamente 21 dias após o parto. *** indica que houve diferenças entre os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), $p < 0,01$ 42

Figura 8. Contagem de folículos antrais (CFA). As comparações foram realizadas entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto DUC, as categorias primíparas (DUC(P)) e múltiparas (DUC(M)) com doença uterina clínica pós-parto, os dois momentos, em torno de 21 e 45 dias após o parto. Também foram analisadas as interações entre (*Grupo x Dia*) e (*Grupo (Cat.) x Dia*). 46

Figura 9. Painel A e B – Proporções de folículos pequenos ($< 4,0$ mm), intermediários (entre 4,0 e 8,5 mm) e dominantes ($> 8,5$ mm) sobre a contagem de folículos antrais (CFA) nos ovários direitos e esquerdos, respectivamente. As comparações foram realizadas entre: as categorias primíparas (DUC(P)) e múltiparas (DUC(M)) com doença uterina clínica pós-parto, e os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC) em dois períodos, aproximadamente 21 e 45 dias após o parto. Também foram analisadas as interações entre (*Grupo x Dia*) e (*Grupo (Cat.) x Dia*). *** indica que houve diferenças entre os D21 e D45 para o grupo DUC, $p < 0,01$ 47

Figura 10. Painéis A e B – Área ovariana (AO) em cm^2 e área ovariana corrigida (AOC) em cm^2 , respectivamente, em relação aos grupos de múltiparas: com ausência de doença reprodutiva (ADR-M) e com doença uterina clínica pós-parto (DUC-M). Os dados foram coletados por ultrassonografia auxiliada por palpação retal por volta do dia 21 e 45 após o parto. As variáveis foram analisadas e calculadas em laboratório. * indica que houve uma tendência entre os grupos ADR-M e DUC-M, $0,05 \leq p \leq 0,10$ 50

Figura 11. Painéis A e B - Volume ovariano (VO) em cm^3 e volume ovariano ajustado (VOA) em cm^3 , respectivamente, quanto aos grupos de múltiparas: com ausência de doença reprodutiva (ADR-M) e com doença uterina clínica pós-parto (DUC-M). Os dados foram coletados por ultrassonografia auxiliada por palpação retal por volta do dia 21 e 45 após o parto. As variáveis

foram analisadas e calculadas em laboratório. ** indica que houve diferenças entre os grupos ADR-M e DUC-M, $p < 0,05$ 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias com intervalos de confiança de 95% correspondentes ao número de dias em relação ao parto para a coleta de dados clínicos e reprodutivos de primíparas e multíparas: pré-parto, 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a pós-parto.....	36
Tabela 2. Médias das diferenças de (PC \pm EPM) e (ECC \pm EPM) entre as quatro aferições em relação aos grupos ADR e DUC.....	37
Tabela 3. Proporção de observações com corpo lúteo (CL) e volume de CL analisados em ovários de vacas leiteiras, em dois momentos distintos.	44
Tabela 4. Quantidade e volume de folículo dominante (FD) analisados em ovários de vacas leiteiras, em dois momentos distintos.....	45
Tabela 5. Área ovariana (AO) e área ovariana corrigida (AOC) obtidas de vacas leiteiras em dois períodos.....	48
Tabela 6. Volume ovariano (VO) e volume ovariano ajustado (VOA) obtidos de vacas leiteiras em dois períodos.....	49

1 INTRODUÇÃO

O período de transição, marcado por alterações metabólicas e físicas, como o balanço energético e proteico negativo (BEPN) e o parto, associadas à fatores estressantes, apresenta importantes desafios que podem afetar a eficiência produtiva, o desempenho reprodutivo e a sobrevivência de vacas leiteiras (GRÖHN e RAJALA-SCHULTZ, 2000; CARVALHO *et al.*, 2019), além do funcionamento adequado das células do sistema imunológico, essencial para proteger o útero de bactérias patogênicas (BRONZO *et al.*, 2020).

As doenças uterinas são multifatoriais e podem ser causadas por infecções bacterianas mistas (BICALHO *et al.*, 2012; JEON *et al.*, 2015) e mostram potencial de ser subclínicas ou clínicas devido à intensidade do processo inflamatório. As doenças uterinas clínicas são prevalentes nos primeiros 21 dias pós-parto e a maior incidência é observada até o décimo dia após o início da lactação, caracterizando-se por comprometimento sistêmico, aumento de volume do útero e presença de secreção purulenta branca amarelada ou aquosa marrom avermelhada, podendo evidenciar odor pútrido (LEBLANC *et al.*, 2011; SHELDON *et al.*, 2006; STOJKOV *et al.*, 2015). O efeito destas doenças na produtividade leiteira é relevante, pois vacas que as manifestam têm redução da produção de leite, baixa fertilidade e são mais propensas à morte e ao descarte involuntário (GIULIODORI *et al.*, 2013; STANGAFERRO *et al.*, 2016; WITTRUCK *et al.*, 2011).

No constante a fertilidade, vacas com involução uterina livre de doenças no pós-parto são capazes de restabelecer mais rapidamente a arquitetura tridimensional ovariana. Esta arquitetura inclui tecido de suporte com diferentes tipos celulares dispersos em uma matriz extracelular (MEC) significativamente dinâmica (estroma ovariano), no qual desempenha funções por meio de sinalização direta e indireta (KINNEAR *et al.*, 2020; MONNIAUX *et al.*, 2006), para favorecer o desenvolvimento folicular (parênquima ovariano). Portanto, a dinâmica folicular é resultado das interações entre estes compartimentos que estão introduzidos em arcabouços orgânicos de formatos elipsoides (ovários), que aumentam e diminuem suas dimensões, remodelando estruturas, orquestrando ovulações e permitindo investigações sobre a performance reprodutiva de fêmeas bovinas.

A fertilidade é fator limitante em vacas leiteiras, pois o menor desempenho reprodutivo está correlacionado com a maior produção de leite (ROYAL *et al.*, 2000; PRYCE *et al.*, 2004). Os marcadores fenotípicos de fertilidade são: Contagem de folículos antrais (CFA), concentração de hormônio anti-Mulleriano (AMH) e biometrias ovarianas (BURNS *et al.*, 2005; MURASAWA *et al.*, 2005; IRELAND *et al.*, 2008; RICO *et al.*, 2009). Esses preditores

apresentam correlação positiva com as variáveis: capacidade de reserva folicular ovariana (IRELAND *et al.*, 2008), resposta superovulatória (SINGH *et al.*, 2004), longevidade de rebanho (RIBEIRO *et al.*, 2014; JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2015), menores intervalos entre parto-concepção, melhores taxas e manutenções de prenhez e maiores concentrações de progesterona (P4) (MARTINEZ *et al.*, 2016). A CFA e o AMH também estão associados positivamente às dimensões, como peso, comprimento (c), altura (h), largura (l), bem como área (AO) e volume ovarianos (VO) (MURASAWA *et al.*, 2005; IRELAND *et al.*, 2008).

A hipótese deste estudo estabelece que vacas leiteiras ao manifestarem doenças uterinas clínicas nos primeiros dias após o parto, vão apresentar impactos negativos sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana.

Em vista disso, o objetivo deste estudo foi associar o impacto da doença uterina clínica pós-parto sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana de vacas leiteiras em dois momentos, aos 21 e aos 45 dias pós-parto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Período de transição

O perfil metabólico sofre alterações ao longo da gestação, parto e início da lactação em vacas leiteiras (ROCHE *et al.*, 2013). O estabelecimento da funcionalidade da glândula mamária no final da gestação leva a uma hipocalcemia de curta duração e um BEPN fisiológicos, pois os animais não aumentam consumo para atender a demanda de energia e nutrientes causadas pela recuperação tecidual e produção de leite após o parto (BRADFORD *et al.*, 2015). Dessa forma, há adaptação do metabolismo, incluindo o desacoplamento do eixo somatotrópico (BAUMGARD *et al.*, 2017) com resistência periférica à insulina, aumento da lipólise, comprometimento da função imunológica e regulação da inflamação (SHELDON *et al.*, 2019).

O fígado, órgão responsável pela metabolização dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) e aminoácidos (AA) para síntese proteica (ZHOU *et al.*, 2016), expressa aumento significativo de seu metabolismo, passando para exigência máxima (BOBE *et al.*, 2004) no decorrer do terço inicial da lactação. Neste período, diferentes fatores de risco, como instalações inadequadas, dietas fornecidas com alto teor de energia e manejos estressantes, além de doenças crônicas, podem levar a desequilíbrios nutricionais e/ou redução da ingestão de matéria seca, o

que causam BEPN e lipomobilização não fisiológicos, prejudicando a função hepática, cicatrização tecidual e defesa imunológica (SORDILLO E RAPHAEL, 2013).

Nesse período ocorre também o evento parto, marcante para a produção leiteira, pois os animais são submetidos a vários desafios que podem afetar lactações e desempenhos reprodutivos futuros. A adaptação inadequada a essas mudanças pode deixá-los predispostos a distúrbios metabólicos como cetose, esteatose hepática, acidose e deslocamento de abomaso (DRACKLEY, 1999; VERNON, 2005), doenças infecciosas como metrite e mastite (SHELDON *et al.*, 2002b; MULLIGAN *et al.*, 2006), ou alterações relacionadas ao parto, como distocia, retenção dos anexos fetais e laceração vulvo-vaginal (ROCHE *et al.*, 2000; SHELDON *et al.*, 2002a), dentre outros.

Outro impacto importante é a hipocalcemia não fisiológica, problema subjacente ao parto, causada pela homeostase inadequada do cálcio. Este é importante macromineral envolvido na contração do músculo liso, síntese do leite, ativação das células imunológicas e suas necessidades aumentam quatro vezes para atender às demandas da lactogênese nos primeiros dias após o parto (HORST *et al.*, 1997).

Desse modo, durante o período de transição que corresponde aos 21 dias antes e após o parto, podem ser desencadeados quadros metabólicos e condições inflamatórias que afetam negativamente a saúde e o desempenho dos animais, alterando proteínas plasmáticas de fase aguda, enzimas hepáticas e espécies antioxidantes (MEZZETTI *et al.*, 2020). Como consequência, destaca-se uma série de problemas clínicos inter-relacionados e com possíveis ações sinérgicas (MULLIGAN e DOHERTY, 2008; HAILEMARIAM *et al.*, 2014).

2.2 Balanço Energético e Proteico Negativo

A perda de peso (PC) e escore de condição corporal (ECC) associados ao BEPN afetam o período de anestro no pós-parto em vacas leiteiras (OPSOMER *et al.*, 2000; ROCHE *et al.*, 2007). Consequentemente, os aumentos das concentrações séricas de NEFA, beta-hidroxiacetato (BHB), aspartato aminotransferase e gama glutamil transferase foram demonstrados em animais que não ovularam até três semanas após o parto, indicando intervalos mais longos até a primeira ovulação (MEIKLE *et al.*, 2004; WATHES *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009), o que apoia a importância da função hepática na retomada da atividade ovariana (KAWASHIMA *et al.*, 2016).

Ainda sobre a função hepática, e com o desacoplamento do eixo somatotrópico que ocorre após o parto de vacas leiteiras, resulta em reduzida expressão de mRNA para o receptor de

somatotropina (GHR), o que não consegue metabolizar quantidades suficientes de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), alterando a função reprodutiva subsequente (LUCY, 2008; LUCY *et al.*, 2009). Portanto, devido o funcionamento ineficiente desta via não há modulação das ações das gonadotrofinas durante o crescimento folicular ovariano (ARMSTRONG e WEBB, 1997). O IGF-1 funciona como fator de crescimento, possuindo ações autócrinas, parácrinas e endócrinas sobre o metabolismo intermediário, proliferação, crescimento e diferenciação celular (JONES e CLEMMONS, 1995) dos compartimentos ovarianos. Assim, o aumento das concentrações séricas de IGF-1, corresponde menos dias desde o parto até a primeira ovulação e menor intervalo parto-concepção (SILVEIRA, 2019).

2.3 Estresse térmico

Fornecer resfriamento evaporativo às vacas no período de transição, expostas ao estresse térmico por calor, aumentou proliferação de linfócitos (DO AMARAL *et al.*, 2010), e melhorou fagocitose e explosão oxidativa de neutrófilos (DO AMARAL *et al.*, 2011). Assim, a hipertermia afeta as células do sistema imunológico, podendo levar a doenças mais severas. Thompson e Dahl (2012) relataram que vacas expostas a esse tipo de estresse durante o período pré-parto apresentaram maior incidência de retenção das membranas fetais, mastite e problemas respiratórios. Além disso, essa condição de estresse também tem impactos negativos na reprodução, devido aos efeitos da hipertermia sobre o crescimento folicular, qualidade do oócito, ovulação, desenvolvimento inicial do embrião, função endometrial e ambiente hormonal endócrino (WOLFENSON e ROTH, 2019).

2.4 Doenças uterinas

A involução uterina, que inclui redução do volume do útero, eliminação da contaminação bacteriana, regeneração do endométrio e retomada da atividade ovariana, constitui fase crítica no ciclo reprodutivo (FRAZER, 2005) e é pré-requisito para uma gestação subsequente (SHELDON *et al.*, 2008). O aumento do risco de doenças uterinas é a fusão do estado de imunossupressão (PASCOTTINI e LEBLANC, 2020) com determinada intensidade negativa de energia (DRACKLEY, 1999) e proteína (LARSEN *et al.*, 2014), além da alteração do quadro metabólico (ROCHE *et al.*, 2013) e a concorrência por demandas em nutrientes para lactação e resposta imunológica, incluindo AA (ISERI e KLASING, 2014), que ocorre nos primeiros dias

após o parto (VELÁZQUEZ *et al.*, 2019). Também a inflamação crônica pode resultar na deficiência da regeneração endometrial (LUCY, 2003; LEBLANC, 2014).

As infecções uterinas são prejudiciais à retomada da atividade cíclica, porque a inflamação afeta o crescimento e a função dos primeiros FD por meio de mecanismos neuroendócrinos que inibem a secreção de GnRH e LH (WILLIAMS *et al.*, 2001). Ademais, existem mediadores inflamatórios decorrentes da contaminação bacteriana no útero, que sensibiliza os ovários e por consequência suprime a secreção de estradiol e diminui a taxa de crescimento folicular (SHELDON *et al.*, 2002b).

Portanto, a infecção uterina é comum no período pós-parto e pode ter ação negativa na atividade ovariana (BROMFIELD e SHELDON, 2013). Assim, o sucesso reprodutivo subsequente de vacas leiteiras está relacionado a múltiplos fatores, como saúde, involução e regeneração do útero, e retomada do funcionamento ovariano (GALVÃO *et al.*, 2004; CHEBEL *et al.*, 2006; MCCOY *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; LEBLANC, 2014).

2.5 Dinâmica folicular pós-parto

A retomada da atividade ovariana após o parto desempenha papel importante na fertilidade subsequente em vacas leiteiras (DARWASH *et al.*, 1997b; SMITH e WALLACE, 1998). O desenvolvimento folicular ocorre em ondas e ciclos nas fêmeas bovinas (RAJAMAHENDRAN e TAYLOR, 1990; SÁVIO *et al.*, 1990a), que possuem duas ou três ondas foliculares durante um ciclo estral normal (IRELAND *et al.*, 2000).

Em animais que têm sua primeira ovulação após uma onda folicular, as concentrações séricas de P4 são aumentadas precocemente, o que podem prejudicar o equilíbrio do sistema imunológico e retardar a involução do útero, deixando-o suscetível a ocorrência de infecções (LEWIS, 1997). Em contrapartida, vacas que dispõem de quatro ou mais ondas ou desenvolvem cistos foliculares, exibem anestros que podem ser explicados pela falha de ovulação de um FD (ROCHE *et al.*, 2000). Então, animais com quatro ou mais ondas exprimem maior produção de leite em comparação aos que apresentam até três ondas foliculares antes da primeira ovulação pós-parto (SAKAGUCHI *et al.*, 2004).

Conforme Sakaguchi *et al.* (2004), as frequências de ovulação foram maiores em primíparas com 58% e 50%, em comparação com múltíparas, com 33% e 35%, após uma onda folicular, na primeira e segunda ovulação pós-parto, respectivamente. No entanto, não foram detectadas diferenças nas proporções de primíparas e múltíparas com várias ondas foliculares até a terceira ovulação. Nenhuma vaca teve acima de quatro ondas foliculares após a segunda

ovulação. A maioria das vacas recupera a normalidade da dinâmica folicular ovariana após a segunda ovulação. Os resultados de Sakaguchi *et al.* (2004) indicaram que vacas em lactação frequentemente apresentam padrões de uma a quatro (ou mais) ondas antes da primeira ovulação. Esses resultados foram confirmados em estudos anteriores em que 74% das vacas ovularam após uma onda, 5% ovularam após três ondas foliculares e 21% tornaram-se císticas (SAVIO *et al.*, 1990a).

A segunda ovulação geralmente ocorre após um período lúteo reduzido (RAJAMAHENDRAN e TAYLOR, 1990; SAVIO *et al.*, 1990b; MCDOUGALL *et al.*, 1995). Para explicar esse fenômeno, Mann e Lamming (2000) postularam que antes da primeira ovulação pós-parto, baixa concentração de estradiol pré-ovulatório pode resultar na geração prévia de mecanismos luteolíticos durante uma fase lútea subsequente. Assim, a dinâmica folicular e os intervalos entre as ovulações em vacas em lactação são restaurados à normalidade após a segunda ovulação pós-parto.

2.6 Primeira ovulação pós-parto

Nutrição, condição corporal (SANTOS *et al.*, 2009), lactação (SILVEIRA *et al.*, 1993), paridade (TANAKA *et al.*, 2008) e doença uterina (SHELDON *et al.*, 2002b; WILLIAMS *et al.*, 2007) podem modificar o intervalo do parto até a primeira ovulação. Em animais saudáveis, esse intervalo é de 21 a 30 dias (SAVIO *et al.*, 1990a; KAMIMURA *et al.*, 1993; SAKAGUCHI *et al.*, 2004). As informações publicadas sobre os resultados do período da primeira ovulação pós-parto no desempenho reprodutivo são contraditórias. Em alguns estudos são demonstrados que o encurtamento desse intervalo está ligado à melhoria da fertilidade (THATCHER e WILCOX, 1973; DARWASH *et al.*, 1997a; KAWASHIMA *et al.*, 2006; GAUTAM *et al.*, 2010), enquanto em outros foram relatados fertilidade reduzida (SMITH e WALLACE, 1998) ou não encontraram efeitos positivos (SAKAGUCHI *et al.*, 2004).

O desempenho reprodutivo inadequado, devido a precoce retomada da atividade ovariana após o parto, é explicado pela imunossupressão e relaxamento muscular, causados pelo aumento da concentração sérica de P4 (CHACIN *et al.*, 1990; BONAFOS *et al.*, 1995). A primeira ovulação antecipada acompanhada de contaminação bacteriana uterina (ETHERINGTON *et al.*, 1984; OPSOMER *et al.*, 2000), está relacionada ao acúmulo de PGE (luteotrópica), ao invés de PGF 2α (luteolítica), em vacas com endométrio inflamado resultando em persistência lútea (SHELDON *et al.*, 2009).

Logo, estudos são necessários para investigar o período ideal para que a primeira ovulação pós-parto ocorra, de forma a viabilizar melhor saúde e menor intervalo de parto a concepção em vacas leiteiras.

2.7 Parênquima ovariano

Os órgãos parenquimatosos são compostos de dois compartimentos: parênquima, ou tecido especializado que desempenha a função do órgão, e estroma, que corresponde ao suporte desse tecido (YOUNG *et al.*, 2014; MESCHER, 2018).

Os folículos, unidades funcionais dos ovários que compreendem o parênquima, contêm oócitos e células (da granulosa e da teca) que produzem hormônios para coordenação do ciclo reprodutivo das fêmeas bovinas. Essas unidades funcionais produzem esteróides e proteínas que regulam as gonadotrofinas, preparam a tuba uterina e o útero para fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário. Em ruminantes, esses hormônios também controlam o momento da receptividade da fêmea e da ovulação (KINNEAR *et al.*, 2020).

As células da granulosa são derivadas de células existentes na superfície dos ovários (SAWYER *et al.*, 2002; BURKHART *et al.*, 2010; GARVERICK *et al.*, 2010; MORK *et al.*, 2012; HUMMITZSCH *et al.*, 2013). Ainda não é esclarecida a origem das células que contribuem para a camada da teca (JUENGEL *et al.*, 2002). Portanto, essas células são responsáveis por influenciar o crescimento e desenvolvimento folicular (SMITH *et al.*, 2009).

Os folículos possuem uma matriz pericelular única denominada lâmina basal que separa as áreas celulares da granulosa e da teca (IRVING-RODGERS e RODGERS, 2006). As células da granulosa produzem os principais componentes, embora as da teca entre outras do estroma ovariano possam também contribuir para a produção dessa lâmina basal (RODGERS *et al.*, 1999). Conforme os folículos crescem, eles remodelam essa lâmina para permitir suas expansões à medida que haja a proliferação das células da granulosa e a formação do antro por meio dos fatores de crescimento e sinalização (KINNEAR *et al.*, 2020). Componentes dessa lâmina são capazes de se ligarem a fatores de crescimento, o que servem como barreira à difusão dessas moléculas entre as camadas de células da granulosa e da teca, permitindo que o fluido folicular e a lâmina basal se tornem reservatórios de elementos para promover a foliculogênese eficiente (MCARTHUR *et al.*, 2000).

2.8 Estroma ovariano

“Estroma intersticial ovariano” ou “células intersticiais da teca” referem-se ao compartimento suporte dos ovários (TINGEN *et al.*, 2011; HUMMITZSCH *et al.*, 2019). O estroma ovariano é composto por componentes gerais, como células do sistema imunológico (WU *et al.*, 2004), nervos (NEILSON *et al.*, 1970), vasos sanguíneos (REEVES, 1971) e linfáticos (BROWN *et al.*, 2010), e específicos que incluem epitélio da superfície (AUERSPERG *et al.*, 2001), túnica albuginea (REEVES, 1971), rete ovarii intraovariana (WENZEL e ODEND'HAL, 1985), células hilares (NEILSON *et al.*, 1970), células-tronco (HUMMITZSCH *et al.*, 2015), células fusiformes semi-caracterizadas semelhantes a fibroblastos, células intersticiais (REEVES, 1971) e dentre outras (KINNEAR *et al.*, 2020). Além desses elementos, encontra-se a MEC, componente base que fornece estrutura e apoio bioquímico às células circundantes (BERKHOLTZ *et al.*, 2006).

2.8.1 Células imunológicas

Macrófagos, predominantes no estroma ovariano, linfócitos B e T, células Natural Killer e dendríticas, além de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (NORMAN e BRANNSTROM, 1994; SUZUKI *et al.*, 1998; CARLOCK *et al.*, 2013; KENNGOTT *et al.*, 2016; FAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020), desempenham múltiplas funções, como fagocitose, apresentação de antígeno, remodelação tecidual via enzimas proteolíticas e sinalização por meio de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (NORMAN e BRANNSTROM, 1994; WU *et al.*, 2004).

Assim, os macrófagos ovarianos participam da homeostase dos processos reprodutivos e podem ser regulados pelos hormônios esteróides (WU *et al.*, 2004; PEPE *et al.*, 2018). Desse modo, os ovários podem conter inúmeros subconjuntos de macrófagos com fenótipos para inflamatório clássico (M1) e remodelamento tecidual alternativo (M2) durante diferentes fases do ciclo estral (CARLOCK *et al.*, 2013; PEPE *et al.*, 2018). Assim, aumento das proporções da classe M2 foram observadas no envelhecimento ovariano murino (BRILEY *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020), e estudos ao utilizar um modelo de camundongo com ausência de macrófagos e outras células mieloides ovarianas, apresentaram resultados como infertilidade dos animais, presença de ovários hemorrágicos, depleção de células endoteliais, prejuízos na formação de CL e redução da produção de P4 (TURNER *et al.*, 2011; CARE *et al.*, 2013).

2.8.2 Nervos e vasos

Alguns nevos seguem os vasos sanguíneos na região medular do ovário, enquanto outros se ramificam entre as células do estroma (NEILSON *et al.*, 1970). No desenvolvimento gonadal embrionário de camundongos, as células resultantes da crista neural colonizam os ovários, diferenciando-se em neurônios e células da glia para formar redes neurais densas na medula que se estendem para regiões corticais (MCKEY *et al.*, 2019). Funcionalmente, tanto a inervação parassimpática quanto a simpática estão presentes nas gônadas femininas, sendo a última responsável por inibir secreção de estradiol e causar vasoconstrição (UCHIDA, 2015).

A microvasculatura ovariana inclui células endoteliais e musculares lisas. Os vasos sanguíneos estão distribuídos pelo tecido conjuntivo para fornecer oxigenação, circulação de hormônios e nutrientes, além da remoção de resíduos (KINNEAR *et al.*, 2020). Dessa forma, essa microvasculatura contribui para foliculogênese e formação dos CL. Os folículos contêm uma lâmina basal entre as células da granulosa e da teca, constituindo uma barreira folicular sanguínea (SIU e CHENG, 2012). Com a formação da camada celular da teca, há desenvolvimento da microvasculatura ovariana que não passa além da lâmina basal e suporta o crescimento do folículo antes da ovulação. Após a ovulação, inicia-se a formação do CL que é bem vascularizado, permitindo que essa microvasculatura invada a camada da granulosa (ROLAKI *et al.*, 2005). Outra função desses vasos sanguíneos é a regulação da tensão de oxigênio que pode ter efeitos sobre as gônadas. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os níveis de oxigênio podem impactar a luteinização de células da granulosa e produção de P4 no CL de fêmeas bovinas e ratas (GAFVELS *et al.*, 1987; BADDELA *et al.*, 2018). Também a fisiopatologia do ovário policístico pode ser explicada pela disfunção da microvasculatura ovariana (DI PIETRO *et al.*, 2018).

A vasculatura linfática inclui microcapilares compostos de células endoteliais sem membrana basal, que possuem espaços para permitir transporte celular, de fluido e macromolecular. Esses capilares drenam substâncias para um conjunto de vasos com membranas basais, válvulas e músculo liso (REEVES, 1971; KINNEAR *et al.*, 2020). Os ovários possuem suas redes linfáticas associadas à vasculatura sanguínea, estendendo-se desde a medula até o córtex adjacente aos folículos em desenvolvimento, com alguma variabilidade de espécies em relação à presença no CL (BROWN e RUSSELL, 2014). O sistema linfático mantém a homeostase dos fluidos, no qual devolve líquido extravascular e proteínas à corrente sanguínea e participa do fluxo de células imunológicas (KINNEAR *et al.*, 2020). Segundo

Brown *et al.* (2010), a vasculatura linfática se remodela em resposta à regulação hormonal em ovários de camundongos.

2.8.3 Epitélio superficial

A camada epitelial cuboidal de ovários bovinos constitui superfície plana e heterogênea (AUERSPERG *et al.*, 2001), rica em queratina, o que facilita reparo após a ovulação quando se expande e contrai dinamicamente devido as alterações ovarianas cíclicas (XU *et al.*, 2018; HARTANTI *et al.*, 2020). Microscopia eletrônica de varredura e imunofluorescência do epitélio superficial de ovários fetais bovinos em desenvolvimento demonstraram expansão da região hilar para circundar todo o órgão, com alterações correspondendo ao rearranjo estromal subjacente (HARTANTI *et al.*, 2020). As células epiteliais da superfície ovariana foram consideradas fonte de desenvolvimento para células da granulosa, e estudos mais recentes propõe que tanto umas quanto outras compartilham um progenitor comum, as células da crista gonadal semelhante a epitelial (AUERSPERG *et al.*, 2001; HUMMITZSCH *et al.*, 2013).

2.8.4 Outros componentes

A túnica albugínea, sob a superfície epitelial, é uma bainha fina e hipocelular de tecido conjuntivo, que serve como proteção para os ovários. Essa estrutura é rica em colágeno e sofre constante remodelação (REEVES, 1971). Usando microscopia eletrônica, Okamura *et al.*, (1980) observaram redução de feixes de colágeno no ápice de folículos humanos à medida que estes atingiam a fase pré-ovulatória. Esta degradação foi acompanhada por aumento de fibroblastos apicais que expressaram em seus citoplasmas grânulos semelhantes à lisossomas, que os autores supunham conter collagenases.

A rete ovarii intraovariana são remanescentes dos ductos de Wolff ou mesonéfricos (WENZEL e ODEND'HAL, 1985). Em estudo de linhagens de células da teca murina, uma das duas populações progenitoras identificadas migraram do mesonefro adjacente e, portanto, estão relacionadas à rete ovarii intraovariana (LIU *et al.*, 2015; ROTGERS *et al.*, 2018). As origens da vasculatura linfática também foram conectadas à rete ovarii intraovariana (SVINGEN *et al.*, 2012).

As células localizadas no hilo ovariano são semelhantes às células testiculares de Leydig, e estão frequentemente localizadas em agrupamentos associados a um tronco nervoso (NEILSON *et al.*, 1970), no qual sintetizam e secretam andrógenos em resposta à estimulação

de LH, embora seu papel fisiológico não tenha sido bem estabelecido (ERICKSON *et al.*, 1985). A hiperplasia dessas células pode levar a virilização em mulheres na pós-menopausa (DELIBASI *et al.*, 2007).

2.8.5 Células-tronco

Segundo Hummitzsch *et al.* (2015), os ovários podem conter células-tronco com o potencial de recompor células somáticas (da granulosa, epitelial de superfície, da teca, estromal) e germinativas (oogônias). A presença e importância das células-tronco germinativas ovarianas têm sido alvo de discussões científicas, embora a reserva folicular seja geralmente perdida com a idade, sem renovação significativa (JOHNSON *et al.*, 2004; ZARATE-GARCIA *et al.*, 2016; LEI e SPRADLING, 2013; ZHANG *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2020). O estabelecimento de oogônias utilizando células de fragmentos de tecido cortical ovariano de humanos presentes em aspirados foliculares formou células semelhantes à oócitos (DING *et al.*, 2016). Conforme Wu *et al.* (2017), células purificadas e cultivadas da linha germinativa de um camundongo transgênico fêmea se diferenciaram em oócitos capazes de gerar descendentes. A presença de células-tronco germinativas ovarianas ainda é contestada no meio científico, geralmente encobrendo discussão sobre células-tronco somáticas. Células-tronco mesenquimais humanas originadas do líquido amniótico foram usadas para restaurar a função ovariana em ratas, sugerindo importante papel para células-tronco somáticas na sinalização parácrina e no microambiente estromal (LIU *et al.*, 2019).

2.8.6 Células estromais

A maior parte do estroma ovariano é composta por células fusiformes semelhantes a fibroblastos e células intersticiais que secretam proteínas com funções de suporte, estrutura e reparação para MEC (REEVES, 1971). Embora estudos recentes de sequenciamentos de RNA humanos confirmaram a presença de múltiplos conjuntos de células estromais (FAN *et al.*, 2019), ainda faltam pesquisas para melhor caracterização desses tipos. A distribuição e os subtipos de células estromais diferirão de acordo com suas localizações nos ovários e normalmente são afetados por alterações estruturais cíclicas. Ademais, mudanças são evidentes ao longo da vida reprodutiva, incluindo o aumento de colágeno fibrótico na MEC (BRILEY *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). Atualmente, existem diversos marcadores celulares e moleculares para identificar populações de células da teca e estromais ovarianas

semicaracterizadas, o que, portanto, facilitará análises futuras (HUMMITZSCH *et al.*, 2013; ROTGERS *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019; WAGNER *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

2.8.7 Matriz extracelular ovariana

A MEC, proveniente do estroma ovariano, é formada por colágenos distribuídos em camadas concêntricas conectadas por feixes (LIND *et al.*, 2006), fibronectina e laminina formadoras de fibrilas, bem como redes de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (BERKHOLTZ *et al.*, 2006; IRVING-RODGERS e RODGERS, 2006). As células estromais secretam componentes solúveis e enzimas, que reticulam os elementos dessa MEC em malhas (THEOCHARIS *et al.*, 2016). Ouni *et al.* (2019), examinou a MEC do córtex ovariano humano e demonstrou que os colágenos compreendem quase metade das proteínas, principalmente o colágeno VI. Enquanto, Henning *et al.* (2019), que investigou as diferenças de composição da MEC entre córtex e medula ovarianos de suínos, identificou expressão aumentada de colágeno I, arginina, microfibrila de elastina I e fibronectina no córtex em comparação com a medula. Essas análises proteômicas comprovaram mais de 80 tipos de proteínas ou glicoproteínas na MEC (HENNING *et al.*, 2019; OUNI *et al.*, 2019).

A composição e estrutura da MEC diferem de acordo com a região ovariana. O córtex, onde estão contidas fibras de colágenos alinhadas radialmente que confere aumento de rigidez em sua MEC e folículos primordiais inertes, e a medula, menos densa, composta por uma rede de poros com fibras de colágenos anisotrópicas onde os folículos antrais remodelam sua MEC através da degradação proteolítica à medida que atingem os estágios pré-ovulatórios. Dessa forma, são encontradas diferenças entre as células estromais produtoras de MEC da cortical e medular ovarianas (LARONDA *et al.*, 2015; CHITI *et al.*, 2018; KINNEAR *et al.*, 2020). As propriedades mecânicas apresentam relevâncias na mecano-transdução dos folículos à medida que são ativados. A inatividade do folículo primordial é regulada pela via de sinalização Hippo, onde a rigidez do córtex ovariano desativa a proteína associada ao desenvolvimento e o coativador transcricional de ligação, corroborando a importância destas particularidades da MEC na manutenção da reserva folicular (KAWAMURA *et al.*, 2013). Hornick *et al.* (2012) verificou que após a ativação, os folículos em estágio inicial de crescimento ainda são dependentes de uma matriz rígida. Com o desenvolvimento dos antros, os folículos passam a requerer uma MEC mais densa fornecida pela região medular dos ovários. Assim, foram mostrados em estudos *in vitro* melhores expansões e esteroidogêneses de folículos antrais em matrizes mais permissivas (WEST *et al.*, 2007; WEST-FARRELL *et al.*, 2009).

Os componentes da MEC desempenham funções por meio de sinalização direta e indireta. Fibronectina e laminina contêm sequências de ligação à integrina que permitem que as células possam interagir diretamente e iniciar cascatas de sinalização para proliferação e diferenciação à medida que os folículos se desenvolvem (MONNIAUX *et al.*, 2006). Por outro lado, as atribuições indiretas da sinalização ocorrem devido aos fatores de crescimento e citocinas que medeiam a apresentação de componentes da MEC às células (KINNEAR *et al.*, 2020). Desse modo, as células encontradas na MEC, que é estrutura dinâmica dos tecidos, remodela através de metaloproteinases de matrizes, inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz e ativadores de plasminogênio (MCINTUSH e SMITH, 1998).

Os folículos e células do estroma ovariano secretam enzimas para tornar mais densa a MEC e permitir a expansão folicular, e neste processo citocinas e fatores de crescimento reguladores da foliculogênese são liberados, como fatores de crescimento β , de fibroblastos, derivado de plaquetas, de hepatócitos e semelhante à insulina (LOGAN e HILL, 1992). Desta forma, a remodelação da MEC é um mecanismo pelo qual a biodisponibilidade do fator de crescimento pode ser mediada ou interrompida em algumas condições patológicas (MCINTUSH e SMITH, 1998). A degradação da MEC desregulada pode desencadear processos inflamatórios. Em um trabalho de Rowley *et al.* (2020), o ácido hialurônico, glicosaminoglicano que forma fragmentos de baixo peso molecular durante a renovação, foi demonstrado em células estromais murinas cultivadas para aumentar a secreção de citocinas inflamatórias tipo 2 e ativar genes envolvidos no recrutamento de eosinófilos, ao mesmo tempo que leva a efeitos adversos sobre folículos cultivados.

Nos estágios finais da maturação folicular, a MEC desempenha papel importante na ovulação. Os folículos são estimulados pela onda de LH a produzir grandes quantidades de metaloproteinases de matrizes e ativador de plasminogênio para degradar a MEC na região apical do folículo (CURRY e SMITH, 2006). Este processo é ainda amplificado pela liberação do fator de necrose tumoral alfa para promover a produção de colagenase e apoptose de células epiteliais ovarianas (CURRY e SMITH, 2006). O enfraquecimento celular e dos componentes da MEC na região apical, juntamente com a pressão do fluido folicular e aumento da pressão vascular, facilitam a ruptura folicular e a expulsão do oócito para o espaço periovariano (MATOUSEK *et al.*, 2001).

2.9 Contagem de folículos antrais

Animais com menor CFA mostram menor fertilidade (MOSSA *et al.*, 2010), com concentrações baixas de AMH e dimensões ovarianas mínimas. Isso impacta no número total de folículos morfológicamente saudáveis (CUSHMAN *et al.*, 2009; EVANS *et al.*, 2012; MOSSA *et al.*, 2012) e sugere eventos que ocorrem durante a vida fetal, quando é estabelecida a reserva ovariana, e têm o potencial de afetar a *performance* reprodutiva futura desses animais (JUENGEL e SMITH, 2019).

A nutrição deficiente em vacas desde antes da concepção até o primeiro trimestre de gestação resultou em redução da CFA e menores concentrações de AMH na prole feminina (MOSSA *et al.*, 2013). Da mesma forma, vacas com inflamação crônica da glândula mamária durante a gestação, tiveram descendentes do sexo feminino com concentrações mais baixas de AMH aos 12 meses de idade (EVANS *et al.*, 2012).

Lea *et al.* (2006) demonstraram diminuição de Ki67, marcador de proliferação para células germinativas, e aumento da expressão de BAX, indicador pró-apoptótico para folículos primordiais, em fetos do sexo feminino em ovelhas com restrição nutricional durante a gestação, o que indica comprometimento da reserva folicular ovariana. A deficiência na nutrição entre o primeiro mês e meados da gestação em ovinos regulou proteínas associadas às respostas a lesões de bases oxidativas sem aumentar a taxa de apoptose das células germinativas, representando regulação positiva da inibição do ciclo celular para permitir o reparo do DNA dessas células (MURDOCH *et al.*, 2003). Isto pode se manifestar como atraso na germinação e desenvolvimento celular. Portanto, condições que levam à insuficiência placentária e nutrição fetal afetam principalmente o *pool* folicular primordial (DA SILVA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2003).

Além disso, os esteroides também modulam a formação folicular fetal, à medida que os ovários em desenvolvimento expressam seus receptores (JUENGEL *et al.*, 2006; NILSSON e SKINNER, 2009; BURKHART *et al.*, 2010, GARVERICK *et al.*, 2010). Nilsson e Skinner (2009) verificaram que a exposição a concentrações elevadas de P4 *in vitro* durante dois dias resultou em número reduzido de folículos formados. Assim, a P4 parece regular o momento da formação folicular. Por outro lado, o excesso de andrógenos e/ou estrógenos não modifica o número de folículos formados *in vivo*, mas está associado ao aumento do recrutamento durante a vida pós-natal precoce e, portanto, o esgotamento acelerado da reserva ovariana (PADMANABHAN *et al.*, 2012).

Entretanto, sugere-se que a reserva ovariana também possa ser afetada pelo estado inflamatório pós-parto de vacas leiteiras. Foi relatado que a infecção bacteriana uterina perturba o crescimento e a função dos folículos, levando ao acúmulo de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) no líquido folicular, o que por sua vez resulta em aumento de atresia, bem como apoptose das células da granulosa (CHASTANT e SAINT-DIZIER, 2019; SHELDON *et al.*, 2017). Além de alterar as funções foliculares pré-antrais e antrais, também modifica a CFA (CHASTANT e SAINT-DIZIER, 2019; RIBEIRO e CARVALHO, 2017). O crescimento de folículos antrais, que produzem AMH, pode ser influenciado por alterações nas concentrações hormonais e metabólicas induzidas por mudanças agudas na ingestão de nutrientes (SCARAMUZZI *et al.*, 2010; WEBB *et al.*, 2004; WEEB *et al.*, 2007). Esses folículos também são capazes de responder a mediadores inflamatórios, que podem prejudicar seu desenvolvimento (GILBERT, 2019; SHELDON *et al.*, 2014). No entanto, ainda não foram demonstradas evidências diretas de alterações imunológicas ou outras condições de doenças como prejudiciais ao desempenho reprodutivo por meio da influência sobre o número ou a dinâmica dos folículos produtores de AMH. Além disso, não há achados sobre as mudanças na concentração sérica de AMH e o estado de inflamação derivados do BEPN sistêmico e infecções bacterianas do trato reprodutivo que ocorrem durante o período perinatal em vacas leiteiras (OKAWA *et al.*, 2021).

2.10 Medidas ovarianas

O uso da ultrassonografia transretal no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas é uma técnica importante para avaliar as medidas ovarianas, o que pode indicar a arquitetura funcional e a retomada da atividade ovariana eficiente. As determinações ultrassonográficas de referências das dimensões ovarianas de bovinos, principalmente os volumes ainda não foram realizadas anteriormente. Ao contrário, o volume ovariano humano foi extensivamente investigado (CRANE e MUIRHEAD, 2020). Nardo *et al.* (2002) utilizaram a abordagem ultrassonográfica transvaginal 3D para determinar que as medições de formas elipsóides prolato são métodos precisos de avaliação do volume em ovários humanos.

Como nos humanos, os ovários das vacas apresentam formato elipsóide prolato, portanto, existe a mesma precisão para determinação dos volumes ovarianos bovinos. Entretanto, as avaliações de estruturas como o desenvolvimento dos CL e dos FD levam a inflação nas estimativas de volumes ovarianos bovinos. Além disso, a presença e o tamanho dessas estruturas variam de acordo com o dia do ciclo estral. As estratégias a serem consideradas

incluem: remover essas estruturas do cálculo do volume, determinar o efeito do dia do ciclo estral no volume ovariano e/ou estabelecer o dia do ciclo estral para determinações mais precisas de medidas ovarianas (CRANE e MUIRHEAD, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com os regulamentos relativos à proteção de animais experimentais e as diretrizes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob o protocolo nº 025/23.

3.1 Descrição do local e manejo dos animais

O local do experimento foi a fazenda Palmital da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada no município de Ijaci, Minas Gerais, Brasil, latitude de 21° 9' 38" Sul e longitude de 44° 55' 29" Oeste, com altitude de 845 metros acima do nível do mar e pluviosidade mínima de 18 e máxima de 155 mm. As temperaturas mínimas nos meses em que o experimento foi realizado, de março a setembro, variaram de 12 a 19 °C, enquanto as máximas variaram de 23 a 28 °C (INMETRO-BRASIL, 2023).

O rebanho é composto por fêmeas pela raça holandesa, sendo dividido em várias categorias: cria, recria, novilhas, vacas secas, pré-parto e vacas em lactação (não sazonais) com tamanho de 59 a 61 animais com DEL (média ± DP) de 203 ± 48 (mínimo de 47 e máximo de 659 dias), ordenhado três vezes ao dia com produção média de leite de 7.686 kg/vaca/ano.

As instalações são compostas de piquetes para recria, novilhas e vacas secas, e *Free Stall* para vacas em lactação. A dieta é a base de ração mista total (TMR) composta por volumoso (silagem de milho) e concentrado (farelo de soja, caroço de algodão, grão úmido reidratado, calcário, ureia, minerais, vitaminas e bicarbonato de sódio) para atender às exigências de quatro lotes: transição, primíparas, alta e baixa produção. A reprodução é realizada por inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e monta natural para repasse.

3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais

Os animais foram acompanhados por volta dos 14 dias antes da data prevista de parto, D-14, até 5 dias após o fim do período de espera voluntário (PEV) determinado pelo programa

reprodutivo da fazenda, D45. Na data do parto, DO, foram registradas informações zootécnicas referentes ao parto e a progênie, como: paridade, duração de período gestacional, sexo e peso da progênie, histórico de parto, entre outros.

As vacas ($n = 44$) foram alimentadas *ad libitum* para atender às necessidades de manutenção, crescimento e lactação, com paridade de $2,9 \pm 2,3$ (variação de 1 a 14) e produção de $24,7 \pm 3,9$ (mínimo de 12,2 e máximo de 37,2 litros de leite/dia) (médias \pm DP). Todas foram manejadas em instalações *Free Stall*, com camas em areia, desde os 21 dias antes do parto.

No D10 as vacas foram categorizadas por meio das variáveis clínicas como temperatura retal, postura e locomoção, grau de desidratação e escore de descarga vaginal, em dois grupos experimentais: ausência de doença reprodutiva (ADR), definido por animais que não manifestaram, alterações ao parto, sinais clínicos como febre, postura e locomoção “ruim”, grau de desidratação “leve” ou “grave”, e corrimento vaginal ou tiveram muco com consistência “gelatinosa”, não fétido; e doença uterina clínica pós-parto (DUC), determinado pela presença de sinais clínicos (febre, postura e locomoção “ruim”, ou grau de desidratação “leve ou grave”) associados ao corrimento vaginal purulento branco amarelado podendo conter raias de sangue ou muco fino, seroso ou aquoso, marrom-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico, e fétido (odor “pútrido”).

3.3 Desenho experimental

O desenho experimental sobre as aferições e coletas de dados antes e após o parto dos animais está indicado na figura 1.

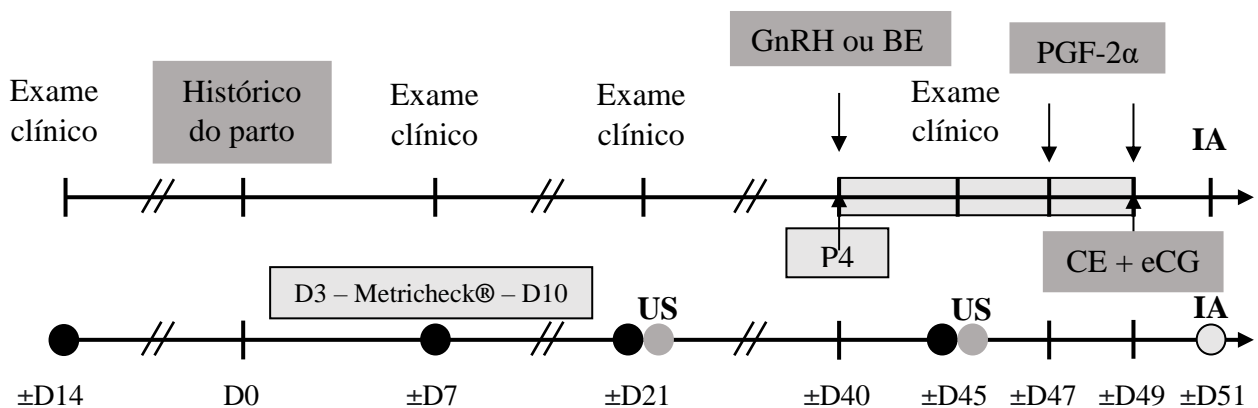


Figura 1. Desenho experimental - as vacas foram examinadas clinicamente nos D-14, D7, D21 e D45. No D10 foram classificadas em dois grupos experimentais: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC). A avaliação e a fixação do *escore* da descarga vaginal foi realizada com o uso do Metrichcek® entre o D3 e o D10 após o parto.

Os exames ultrassonográficos (US) foram realizados em D21 e D45. O protocolo hormonal indicado para iniciar no D40 após o parto visa inseminar os animais no D51. O sinal de \pm indica que os dias foram aproximados.

3.4 Dados clínicos

As variáveis fisiológicas para os exames clínicos foram: Peso corporal (PC) mensurado por meio de fita de perímetro torácico; escore de condição corporal (ECC) avaliado em escala de 5 pontos com incrementos de 0,25 (FERGUSON et al., 1994); temperatura retal (TR) aferida por termômetro digital por volta das 9 h; grau de desidratação (GD) determinado pelo turgor cutâneo, avaliação ocular e coloração de mucosas, classificada em níveis: “normal”, “leve” ou “grave”; postura e locomoção (P/L) indicadas visualmente como “boa” ou “ruim”. As aferições foram feitas por um único operador.

Entre D3 e D10, foi avaliado e fixado o maior valor aferido, do escore de descarga vaginal (EDV) com auxílio do dispositivo Metrichcek®. Previamente, foi realizada a limpeza da vulva com água, seguida da aplicação tópica de iodopolividona degermante e secagem com papel toalha. Antes da utilização em cada animal o Metrichcek® foi desinfetado com solução de água e cloreto de alquil dimetil benzil amônio lavado com solução fisiológica 0,9%. O EDV foi pontuado de 1 a 5: EDV-1 = muco com consistência “gelatinosa”, claro ou translúcido, não fétido, EDV-2 = muco com consistência “gelatinosa”, turvo com manchas de pus, não fétido, EDV-3 = secreção purulenta < 50% pus de coloração rósea, não fétida, EDV-4 = secreção purulenta branca amarelada \geq 50% de pus, não fétida e EDV-5 = muco fino, seroso ou aquoso, castanho-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico, fétido (adaptado de MACHADO et al., 2020).

Todos os 18 animais que desenvolveram doenças uterinas clínicas após o parto foram tratados conforme protocolo definido pela equipe de trabalho. Dessa forma, vacas que indicaram EDV-3 ou EDV-4 associados aos sinais clínicos (TR > 39,2°C, GD “leve” ou “grave” ou P/L “ruim”) ou EDV-5, eram imediatamente tratadas com o protocolo que consistia de 2,0 mg/kg/dia de cloridrato de ceftiofur e 1,0 mg/kg/dia de diclofenaco de sódio, administrado IM, durante 7 e 3 dias, respectivamente. Além desses medicamentos eram administrados 0,52 mg de cloprostenol sódico (análogo da PGF-2 α) IM no início e no fim do tratamento, ou seja, em intervalo de sete dias.

3.5 Dados ovarianos

Os animais foram submetidos aos exames reprodutivos por meio de ultrassom veterinário da marca Mindray®, modelo Z-50 VET, acoplado a transdutor retal de 7,5 MHz, em dois períodos: D21 e D45. O primeiro coincide com o tempo ideal da involução uterina macroscópica, para que os animais apresentem a primeira ovulação e retomem a atividade cíclica ovariana, e o segundo corresponde ao fim do período de espera voluntário (PEV) da maioria das propriedades comerciais, quando os animais estão aptos a entrarem nos programas reprodutivos.

Por volta do D40, as vacas passaram por exames ginecológicos para serem designadas a protocolos de IATF, conforme procedimentos e hormônios utilizados na rotina da fazenda.

Os animais que apresentaram folículo(s) $> 8,5$ mm de diâmetro no D40, foram iniciados (D0 do protocolo) com aplicação IM de 0,0105 mg de acetato de busarelina (análogo do GnRH). Os que demonstraram folículos $\leq 8,5$ mm (fase de recrutamento ou divergência folicular) receberam IM 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE). Ainda nesse dia, as vacas também tiveram a inserção de dispositivo intravaginal de P4 contendo 1,0 g. No (D7), foi administrado IM, 0,52 mg de cloprostenol sódico (análogo da PGF-2 α). No (D9) ocorreu a retirada do dispositivo intravaginal de P4 juntamente com nova aplicação IM de 0,52 mg de cloprostenol sódico, 2,0 mg de cipionato de estradiol (CE) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). Assim, as vacas foram inseminadas entre 48 a 52 h após a remoção do dispositivo intravaginal correspondente ao (D11) do protocolo.

Foram elaborados vídeos de sete segundos, intervalo necessário para o escaneamento adequado de cada ovário (direito e esquerdo) estipulado pela equipe de trabalho, com objetivo de obter dimensões ovarianas como, c, h, l e AO, além de verificar a presença de CL e permitir a CFA nos D21 e D45. Portanto, os dados ovarianos desenvolvidos foram: Proporção de ocorrência e volume de (CL), quantidade e volume de folículo dominante (FD), contagem de folículos antrais (CFA), proporção de folículos pequenos ($< 4,0$ mm), intermediários (entre 4,0 e 8,5 mm) e dominantes ($> 8,5$ mm) em relação à CFA, área ovariana (AO), área ovariana corrigida (AOC), volume ovariano (VO) e volume ovariano ajustado (VOA).

No primeiro exame ultrassonográfico D21, também se examinou o útero com a finalidade de obter o escore de *status* uterino (ESU), pontuado de 0 a 3: ESU-0 = não verificou-se pontos hiperecóticos distribuídos nas imagens uterinas, ausência de doença uterina subclínica; ESU-1 = presença de poucos pontos hiperecóticos exibidos difusamente nas ultrassonografias do útero, resquícios de doença uterina subclínica; ESU-2 = presença de muitos pontos

hiperecóticos difusos nos exames ultrassonográficos uterinos, indicativo de doença uterina subclínica branda; ESU-3 = presença de pontos hiperecóticos concentrados nas imagens do útero, sugestivo de doença uterina subclínica severa.

3.6 Definições e cálculos dos volumes ovarianos

Em cada vídeo ultrassonográfico, foram efetuadas as contagens de folículos pequenos (< 4,0 mm), intermediários (entre 4,0 e 8,5 mm) e dominantes (> 8,5 mm), bem como a investigação da existência de CL. Foi obtida a imagem que representou o maior comprimento ovariano. Assim, foram mensuradas medidas como c, h e AO. Uma segunda imagem foi obtida girando a sonda ultrassonográfica 90° ao redor do ovário. Isso permitiu a medição da l, dimensão necessária para calcular o VO. Outras imagens foram retiradas para o cálculo dos diâmetros máximos de CL e folículos > 4,0 mm (médias entre as duas dimensões perpendiculares máximas).

Os vídeos foram analisados no *software Virtual Dub* versão 1.10.4 (GNU General Public License – USA). Todas as imagens foram obtidas, analisadas e revisadas em laboratório por um mesmo operador, auxiliadas pelo *software Image J* 1.53K (Wayne Rasband and Contributors National Institute of Health – USA). Os cálculos foram efetuados e revisados minuciosamente.

O VO de cada ovário foi determinado conforme fórmula do volume de uma estrutura elipsoide onde, $VO = 0,523 \times (c \times h \times l)$ (ROSENDAHL *et al.*, 2010).

O volume ajustado ovariano (cm³; VOA) foi definido por meio da retirada dos volumes do(s) CL e folículo(s) dominante(s) FD sobre o VO, de acordo com a fórmula matemática: $VOA = [0,523 \times (c \times h \times l)] - 4/3 (\pi r^3) CL - 4/3 (\pi r^3) FD$. Os volumes do(s) CL e FD foram determinados pela fórmula do volume de uma esfera, $v = 4/3\pi r^3$, onde v = volume em cm³, $\pi = 3,14$ e r = raio (½ diâmetro). O objetivo deste cálculo foi remover o(s) efeito(s) do(s) CL e FD com finalidade de obter um valor que representasse com mais precisão o volume de tecido ovariano quando não houvesse confusão de estruturas dominantes.

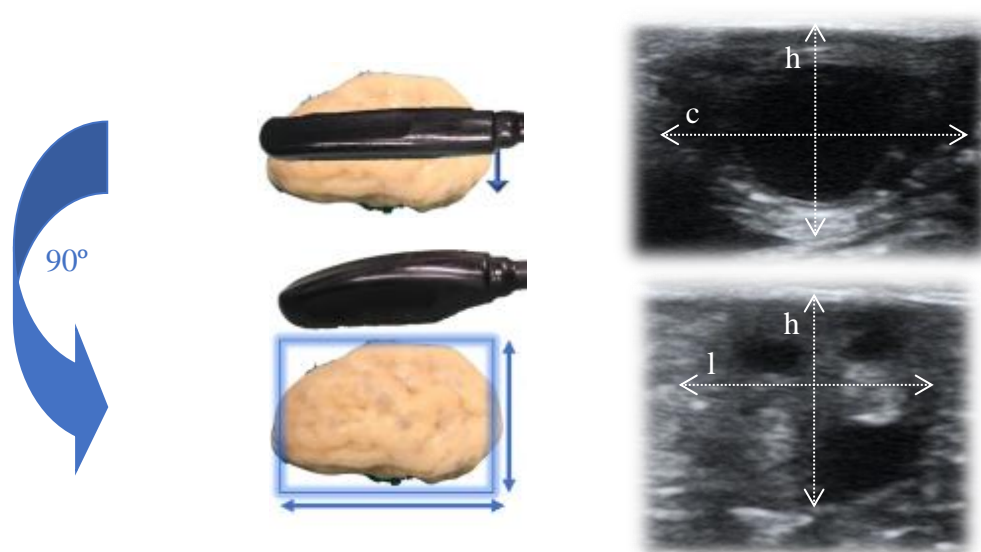


Figura 2. Diagrama representando a técnica de rotação da sonda ultrassônica 90° ao redor do ovário para obter medidas em três dimensões: c (cm; comprimento), h (cm; altura) e l (cm; largura). A h foi determinante para a obtenção da l, assim, ao girar a sonda, a mensuração da “nova h” deveria ser semelhante à encontrada em conjunto com o c.

3.7 Análise estatística

Todas variáveis foram testadas quanto à normalidade e aos ajustes para a melhor forma de distribuição no procedimento *Glimmix* do *software* SAS.

As variáveis clínicas preditoras foram ausência de doença reprodutiva e presença de doença uterina clínica pós-parto. As médias dos dias determinados pelas coletas, diferenças entre as aferições de PC e ECC, TR, ECC, EDV e ESU foram analisadas pelo teste t de *Student*. As proporções em relação a P/L e GD foram avaliadas conforme a distribuição Binomial e Multinomial, respectivamente.

As variáveis ovarianas preditoras foram ausência de doença reprodutiva e presença de doença uterina clínica pós-parto, primíparas e multíparas com doença uterina clínica pós-parto, 1° e 2° exames reprodutivos. A idade dos animais entrou como covariável nas análises ovarianas. Variáveis como o número de CL, FD e a CFA foram examinadas de acordo com a distribuição de *Poisson*, já as variáveis como volumes de CL e FD, bem como AO, AOC, VO, VOA foram trabalhadas estatisticamente como distribuição *Gamma*. Enfim, variáveis como proporções das várias classes de folículos em relação à CFA foram analisadas como distribuição Binomial. Além disso, o modelo contendo efeito (*Grupo x Dia*) e (*Grupo (Cat.) x Dia*) foi testado no procedimento estatístico *Glimmix* do *software* SAS.

Neste estudo foram considerados níveis de significância ($p < 0,05$) e tendência ($0,05 \leq p \leq 0,10$).

4 RESULTADOS

4.1 Animais excluídos

Das 44 vacas acompanhadas no estudo, 10 foram excluídas devido a inviabilização da coleta de dados, o que resultou em sete primíparas e 27 multíparas distribuídas nos dois grupos experimentais: ADR e DUC. As sete primíparas desenvolveram doença uterina clínica pós-parto e foram incluídas no grupo DUC.

4.2 Coletas de dados

Os dados foram coletados com objetivo de minimizar manejo e maximizar bem-estar animal e não se verificou diferenças entre os intervalos, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Médias com intervalos de confiança de 95% correspondentes ao número de dias em relação ao parto para a coleta de dados clínicos e reprodutivos de primíparas e multíparas: pré-parto, 1^a, 2^a e 3^a pós-parto.

Avaliações	Primíparas (IC 95%)	Multíparas (IC 95%)	Valor de p
<i>Pré-parto (dias antes do parto)</i>	13,9 (23,4 – 4,3) ¹	10,5 (13,0 – 8,1) ¹	0,45
<i>Pós-Parto (dias após o parto)</i>			
1 ^a	7,9 (4,9 – 10,7) ²	6,7 (5,8 – 7,5) ²	0,37
2 ^a	24,4 (21,2 – 27,5) ³	22,4 (21,2 – 23,4) ³	0,18
3 ^a	48,7 (35,6 – 61,7) ⁴	44,7 (41,1 – 48,2) ⁴	0,50
<i>n</i>	7	27	

1 – D-14, 2 – D7, 3 – D21, 4 – D45.

4.3 Quadro clínico dos animais

A tabela 2 mostra a diferença das médias de PC e ECC acerca das quatro aferições. As vacas com doenças uterinas clínicas pós-parto apresentaram tendência a maior variação na

média de PC entre as avaliações pré-parto: e 2ª pós-parto ($p = 0,09$), e 3ª pós-parto ($p = 0,10$). A respeito das médias de ECC, foram notadas tendência a maior diferença entre as aferições pré-parto e 1ª pós-parto ($p = 0,09$); contudo, comprovou-se maior diferença entre as aferições pré-parto: e 2ª pós-parto, e 3ª pós-parto, bem como da 1ª e 2ª pós-parto, 2ª e 3ª pós-parto ($p \leq 0,01$), em comparação aos animais com ausência de doença reprodutiva.

Tabela 2. Médias das diferenças de (PC \pm EPM) e (ECC \pm EPM) entre as quatro aferições em relação aos grupos ADR e DUC.

Parâmetro	Diferença entre aferições	Grupo		Valor de p
		ADR ³	DUC ⁴	
PC ¹ (Kg.)	Pré-parto e 1ª pós-parto	14,07 \pm 3,30	24,59 \pm 5,41	0,14
	Pré-parto e 2ª pós-parto	37,33 \pm 4,44*	50,47 \pm 4,60*	0,09
	Pré-parto e 3ª pós-parto	42,07 \pm 7,61*	60,34 \pm 5,46*	0,10
	1ª pós-parto e 2ª pós-parto	22,75 \pm 4,90	20,56 \pm 6,66	0,43
	1ª pós-parto e 3ª pós-parto	25,44 \pm 7,57	32,22 \pm 6,20	0,31
	2ª pós-parto e 3ª pós-parto	2,69 \pm 5,96	11,67 \pm 4,63	0,20
ECC ² (1-5)	Pré-parto e 1ª pós-parto	0,30 \pm 0,03*	0,39 \pm 0,03*	0,09
	Pré-parto e 2ª pós-parto	0,35 \pm 0,04***	0,61 \pm 0,04***	< 0,01
	Pré-parto e 3ª pós-parto	0,40 \pm 0,02***	0,69 \pm 0,05***	< 0,01
	1ª pós-parto e 2ª pós-parto	0,06 \pm 0,02***	0,21 \pm 0,03***	< 0,01
	1ª pós-parto e 3ª pós-parto	0,11 \pm 0,02**	0,29 \pm 0,04**	0,01
	2ª pós-parto e 3ª pós-parto	0,05 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,25

1 – Peso corporal mensurado por meio da fita de perímetro torácico em Kilogramas (Kg.). 2 – Escore de condição corporal avaliado em escala de 5 pontos (FERGUSON *et al.*, 1994). 3 – Grupo de animais com ausência de doença reprodutiva. 4 – Grupo de animais com doença uterina clínica pós-parto. Todos os dados mensurados por único operador. *** e ** apontam significância e * indica tendência entre as médias das diferenças entre os indivíduos dos grupos ADR e DUC, *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ e * $0,05 \leq p \leq 0,10$.

Os animais do grupo DUC expressaram maior TR e menor ECC em relação aos animais do grupo ADR, na 1ª ($p < 0,01$) e nas 1ª, 2ª e 3ª ($p < 0,05$) aferições pós-parto, respectivamente.

Quanto à avaliação visual referente à P/L observou-se nos 1º e 2º, e no 3º, exames após parto, menores e tendência à menor proporção ($p < 0,01$) e ($p = 0,08$), respectivamente, de vacas

com P/L classificada como “boa” ou “adequada” do grupo DUC em comparação ao grupo ADR. No exame clínico pré-parto, não foi notada diferenças em relação ao GD entre os grupos DUC e ADR ($p = 0,48$). Entretanto, na 1ª avaliação clínica pós-parto foi constatada maior proporção de animais com GD leve e grave ($p < 0,01$), no 2º exame observou-se maior proporção de vacas somente com GD leve ($p < 0,01$), e na última avaliação, percebeu-se tendência de maior proporção de animais com GD leve e grave ($p = 0,07$), incluídos no grupo DUC em comparação aos que estão no grupo ADR. Isso é visto nas figuras 3, 4, 5 e 6.

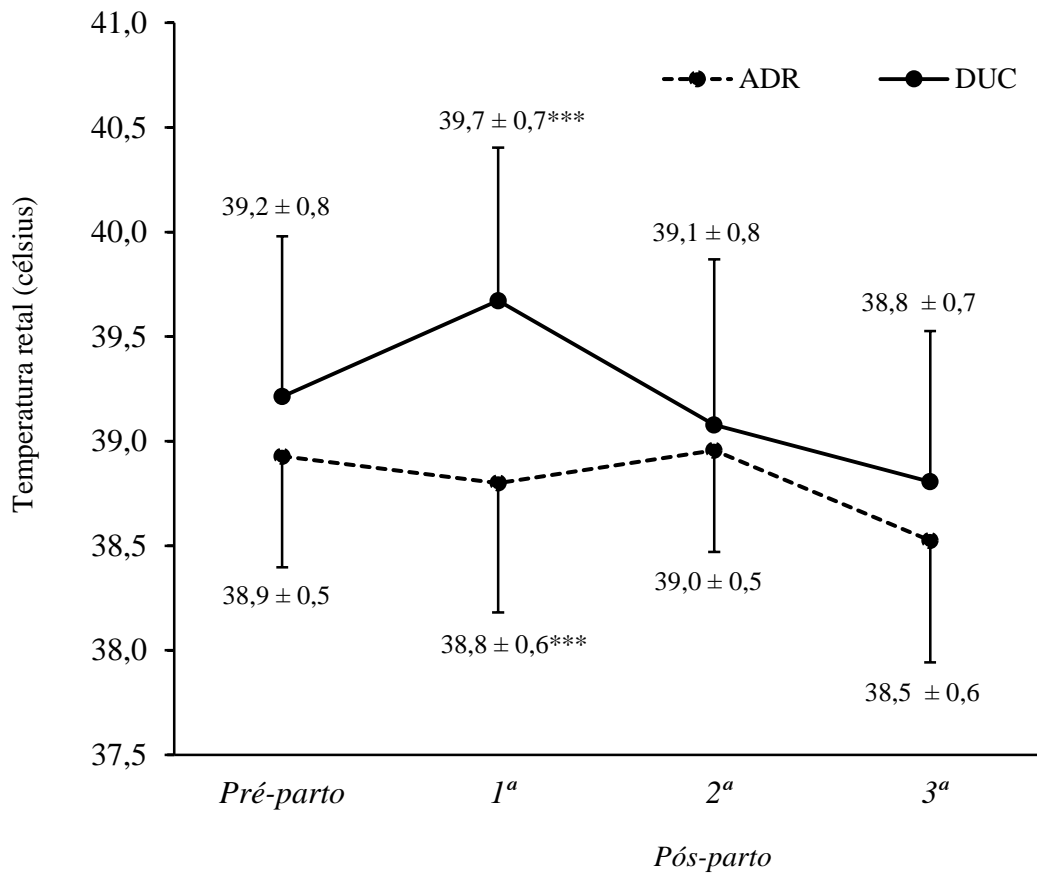


Figura 3. Médias \pm desvios padrões das temperaturas retais avaliadas por meio de termômetro digital em relação às quatro aferições: pré-parto, 1ª, 2ª e 3ª pós-parto. *** indica que houve diferenças entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e e doença uterina clínica pós-parto (DUC), $p < 0,01$.

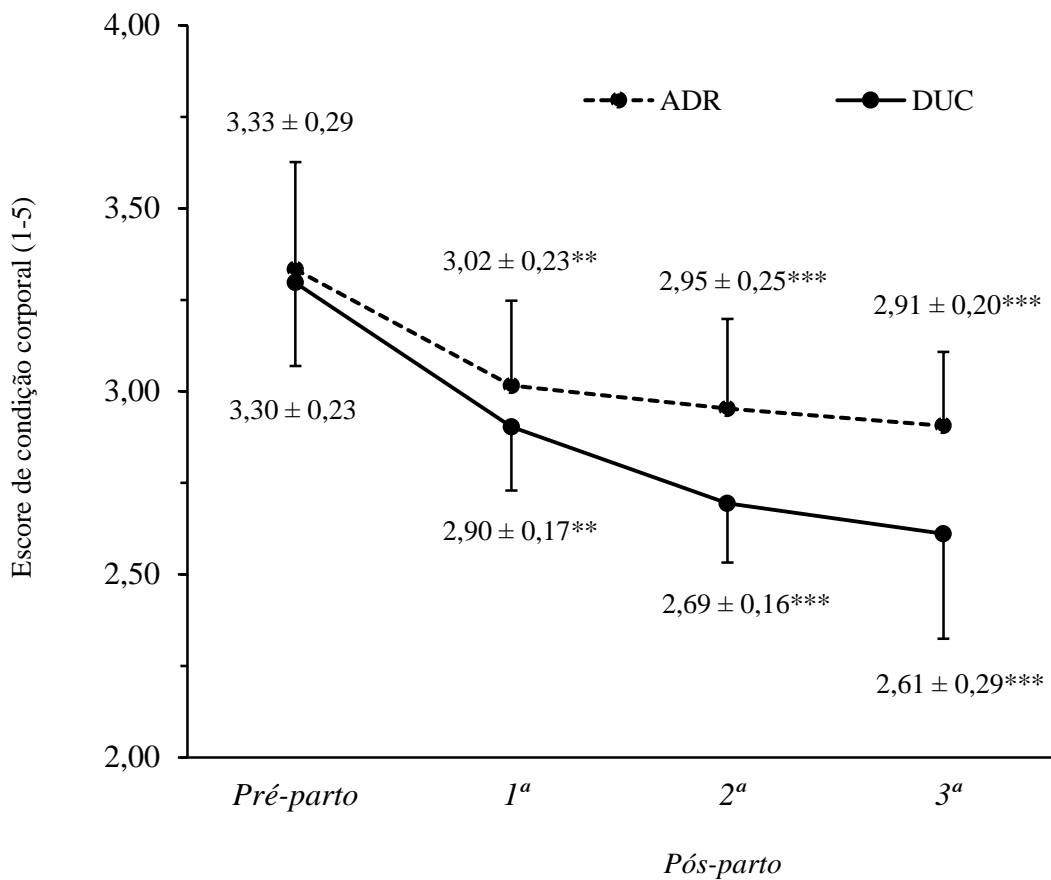


Figura 4. Médias \pm desvios padrões dos escores de condição corporal avaliados segundo Ferguson et al., (1994), a respeito das quatro aferições: pré-parto, 1ª, 2ª e 3ª pós-parto. ** e *** apontam diferenças entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC). Todos os dados foram aferidos por único operador. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

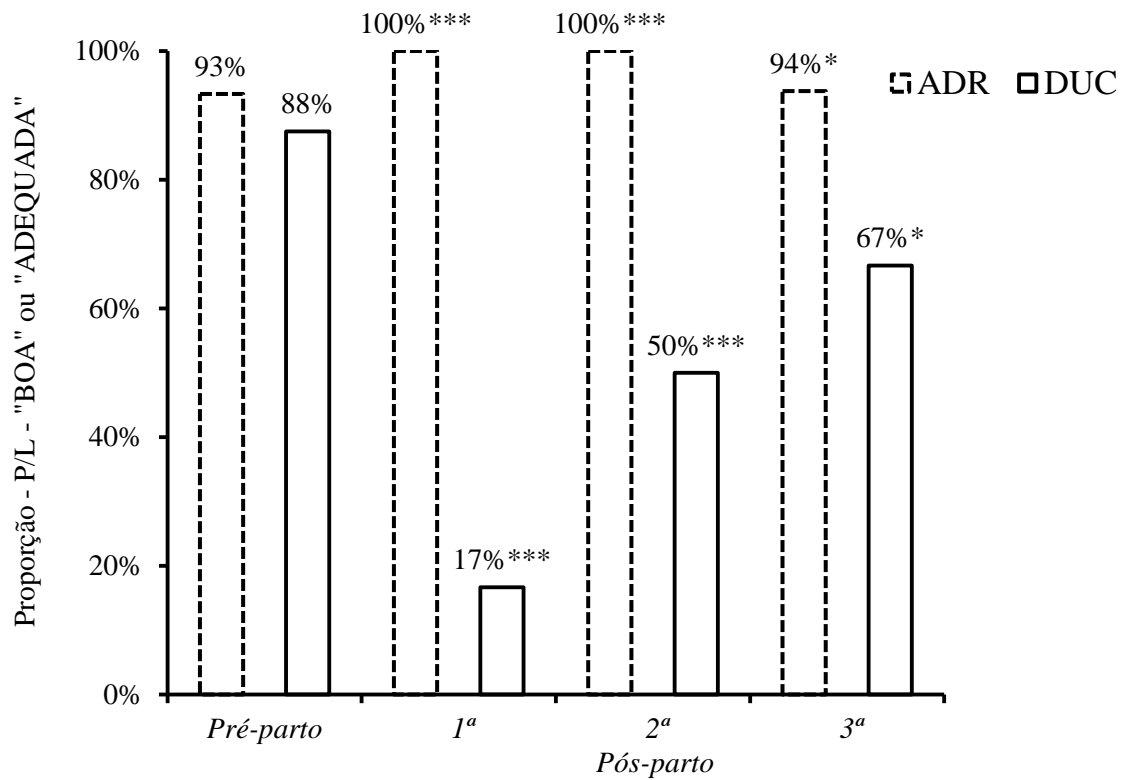


Figura 5. Proporções de animais que apresentaram postura e locomoção (P/L) classificada como “boa” ou “adequada”, de acordo com avaliação visual realizada por um único operador, acerca das quatro aferições: pré-parto, 1ª, 2ª e 3ª pós-parto. *** sugere que houve diferenças e * indica tendência entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), *** $p < 0,01$ e * $0,05 \leq p \leq 0,10$.

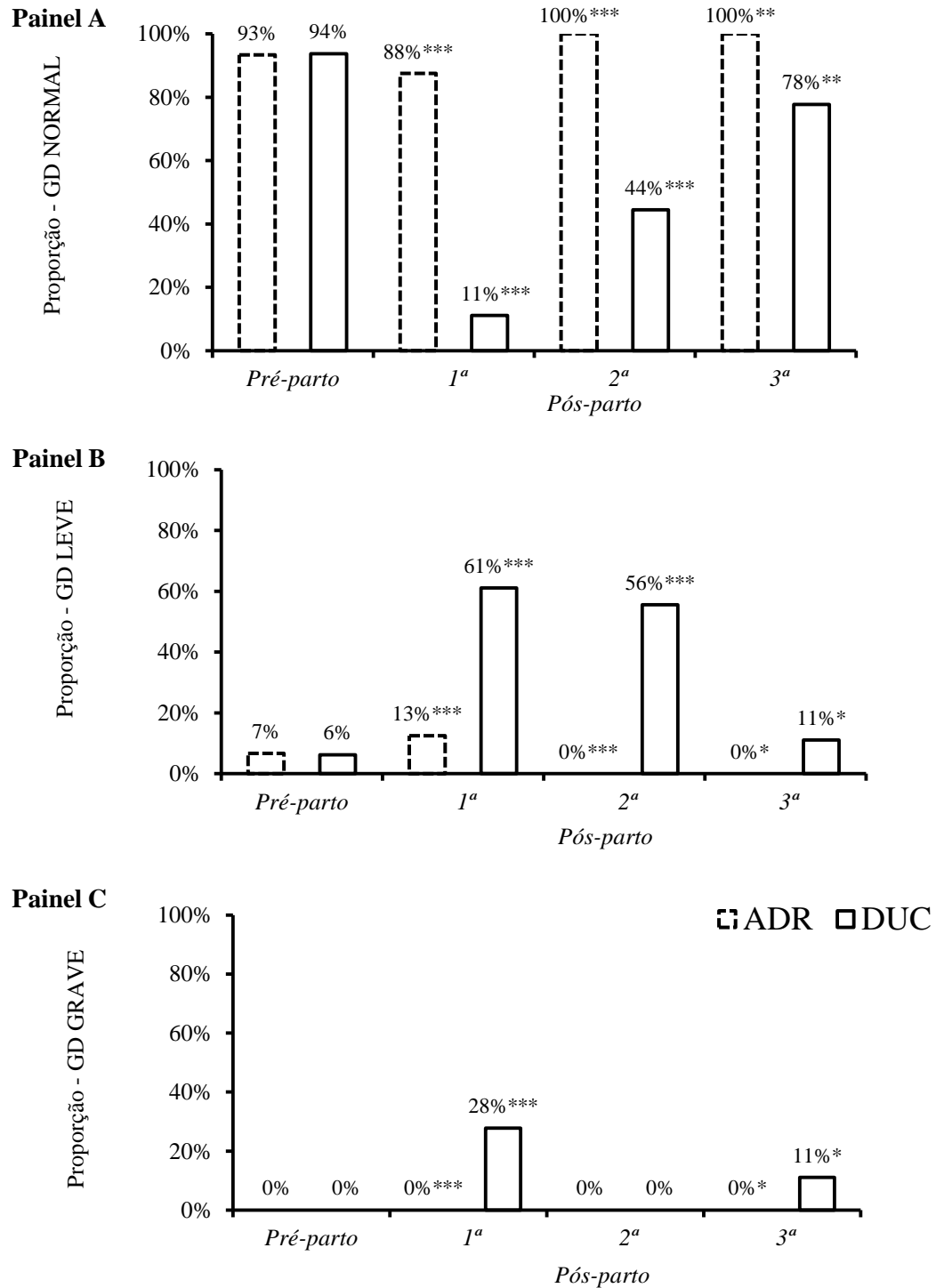


Figura 6. Painéis A, B e C - proporções de animais que exibiram grau de desidratação (GD) classificado como “normal” ou “sem desidratação”, “leve” e “grave”, respectivamente, de acordo com o turgor cutâneo e avaliação visual da endoftalmia, analisados por um único operador, sobre as quatro aferições: pré-parto, 1ª, 2ª e 3ª pós-parto. *** e ** indicam que houve diferenças e * infere tendência entre os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ e * $0,05 \leq p \leq 0,10$.

4.4 Escore de descarga vaginal e *status* uterino

No que se refere à análise da descarga vaginal, realizada entre os D3 e D10, e fixada na maior pontuação averiguada, em conformidade com o EDV (1-5), constatou-se maior média de escore para as vacas do grupo DUC em comparação aos animais do grupo ADR ($p < 0,01$).

Assim como o EDV, no 2º exame clínico e reprodutivo após o parto D21 foi avaliado o ESU (0-3), por um único operador. Dessa forma, verificou-se maior média de escore para os animais do grupo DUC em comparação aos do grupo ADR ($p < 0,01$). Isso é visualizado na figura 7.

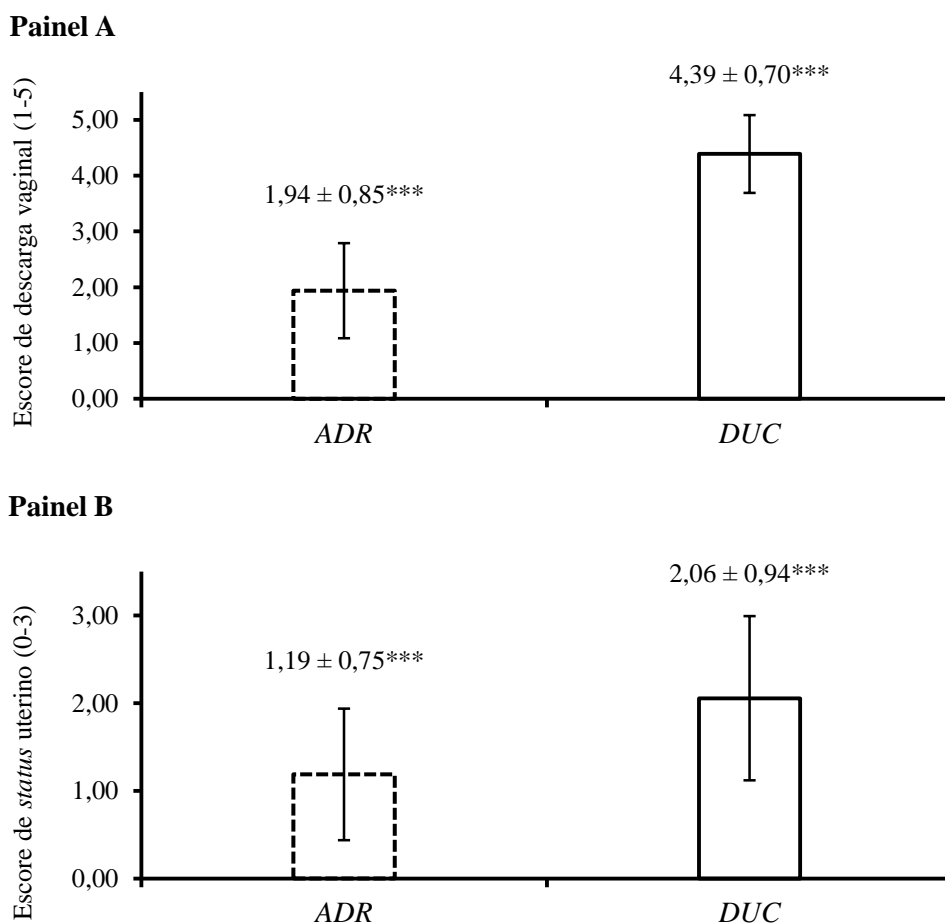


Figura 7. Painéis A e B – médias \pm desvios padrões dos escores de descarga vaginal (EDV) conforme adaptação de Machado et al. (2020) e dos escores de status uterino (ESU), respectivamente. Os escores foram avaliados por um único operador. O EDV foi mensurado entre os D3 e D10 pós-parto e fixado em maior valor averiguado, enquanto o ESU foi analisado por exame ultrassonográfico auxiliado por palpação retal aproximadamente 21 dias após o

parto. *** indica que houve diferenças entre os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC), $p < 0,01$.

Neste estudo identificou-se incidência de 52,94% de doença uterina clínica após o parto em vacas leiteiras.

4.5 Retomada da atividade ovariana

Foi observado maior proporção de animais do grupo ADR, com 68,75%, retomando a atividade cíclica ovariana, definida pela presença de CL, em contraste com o grupo DUC, com 44,44% das vacas expressando CL ($p < 0,05$). Em relação às primíparas, 21,43% voltaram a ciclar em comparação com as multíparas do grupo DUC, com 59,09%, ($p < 0,01$). Houve diferença na ocorrência de CL referente às observações entre o D21, com 44,12%, e o D45, com 67,65%, ($p < 0,05$). Esses resultados estão demonstrados na tabela 3.

A idade não afetou a ocorrência e o volume de CL nos dois momentos avaliados entre os animais ($p = 0,51$). Vacas do grupo ADR obtiveram maior volume de CL, em comparação aos indivíduos que manifestaram doença uterina clínica após o parto ($p < 0,05$). Além disso, observou-se que primíparas indicaram volumes de CL menores em relação a multíparas, pertencentes ao grupo DUC ($p < 0,05$). Essas análises foram realizadas em dois períodos: D21 e D45. No entanto, os volumes de CL indicaram tendência a serem maiores na segunda avaliação ultrassonográfica dos ovários, ($p = 0,07$). Esses resultados estão mostrados nas tabelas 3.

Tabela 3. Proporção de observações com corpo lúteo (CL) e volume de CL analisados em ovários de vacas leiteiras, em dois momentos distintos.

Efeito	Proporção de observações com CL¹	Valor de p	Volume de CL (cm³)²	Valor de p
<i>Idade</i>		0,52		0,51
<i>Grupo ADR</i> ³	68,75% (22/32) ⁹	< 0,05	1,95 ± 0,27	0,01
<i>Grupo DUC</i> ⁴	44,44% (16/36) ⁹		0,89 ± 0,21	
<i>Grupo DUC(P)</i> ⁵	21,43% (3/14) ⁹	< 0,01	0,39 ± 0,16	< 0,01
<i>Grupo DUC(M)</i> ⁶	59,09% (13/22) ⁹		2,04 ± 0,45	
<i>(D21)</i> ⁷	44,12% (15/34) ⁹	< 0,05	1,03 ± 0,22	0,07
<i>(D45)</i> ⁸	67,65% (23/34) ⁹		1,68 ± 0,27	
<i>Grupo x Dia</i>		0,19		0,12
<i>Grupo (Cat.) x Dia</i>		0,62		0,59

1 – Proporção de observações com corpo lúteo (CL). 2 – Médias dos mínimos quadrados relativos ao volume (cm³) de CL em ovários: direito + esquerdo. 3 – Grupo de animais com ausência de doença reprodutiva. 4 – Grupo de animais com doença uterina clínica pós-parto. 5 – Grupo de primíparas com doença uterina clínica pós-parto. 6 – Grupo de multíparas com doença uterina clínica pós-parto. 7 – Primeira avaliação ovariana realizada por volta dos 21 dias após o parto. 8 – Segunda análise ovariana executada aproximadamente 45 dias pós-parto. 9 – Número de ocorrência de CL sobre o número total de observações. p < 0,05 (indica diferença) e 0,05 ≤ p ≤ 0,10 (tendência)

A idade também não afetou a quantidade e o volume de FD nos dois momentos avaliados entre os grupos experimentais (p = 0,41). Vacas do grupo ADR obtiveram maior volume de FD, em comparação aos animais que manifestaram doença uterina clínica após o parto (p < 0,05). Ademais, observou-se que primíparas indicaram volumes de FD menores em relação a multíparas, inseridas no grupo DUC (p < 0,05). Essas análises foram realizadas em dois períodos: D21 e D45. Por fim, foi sugerida interação entre as categorias das vacas relativas ao grupo DUC no tocante ao dia de análise D21 e D45, ou seja, primíparas contribuíram com menor quantidade de FD ao contrário de multíparas na avaliação do D21, ocorrendo o inverso

no D45, isto é, primíparas demonstraram maior número de FD em comparação a multíparas ($p < 0,05$). Esses resultados podem ser vistos na tabela 4.

Tabela 4. Quantidade e volume de folículo dominante (FD) analisados em ovários de vacas leiteiras, em dois momentos distintos.

Efeito	Quantidade (unid.) ¹	Valor de p	Volume (cm ³) ²	Valor de p
<i>Idade</i>		0,51		0,41
<i>Grupo ADR</i> ³	0,93 ± 0,13	0,72	1,26 ± 0,19	0,01
<i>Grupo DUC</i> ⁴	1,03 ± 0,19		0,69 ± 0,10	
<i>Grupo DUC(P)</i> ⁵	0,88 ± 0,29	0,42	0,46 ± 0,13	0,03
<i>Grupo DUC(M)</i> ⁶	1,20 ± 0,24		1,05 ± 0,16	
<i>(D21)</i> ⁷	0,92 ± 0,17	0,98	0,86 ± 0,12	0,52
<i>(D45)</i> ⁸	1,04 ± 0,18		1,02 ± 0,14	
<i>Grupo x Dia</i>		0,46		0,21
<i>Grupo (Cat.) x Dia</i>		0,03		0,90

1 – Médias dos mínimos quadrados referentes à quantidade (unidades) de FD em ovários: direito + esquerdo. 2 – Médias dos mínimos quadrados relativos ao volume (cm³) de FD em ovários: direito + esquerdo. 3 – Grupo de animais com ausência de doença reprodutiva. 4 – Grupo de animais com doença uterina clínica pós-parto. 5 – Grupo de primíparas com doença uterina clínica pós-parto. 6 – Grupo de multíparas com doença uterina clínica pós-parto. 7 – Primeira avaliação ovariana realizada por volta dos 21 dias após o parto. 8 – Segunda análise ovariana executada aproximadamente 45 dias pós-parto.

4.6 Contagem de folículos antrais

A idade dos animais alterou a CFA ($p < 0,05$). Porém, não houve divergência entre a CFA nos grupos ADR e DUC ($p = 0,96$), nas categorias primíparas e multíparas do grupo DUC ($p = 0,99$), nos 1º, D21, e 2º, D45, exames reprodutivos ($p = 0,20$). Não foram observadas interações significativas, $p(\text{Grupo} \times \text{Dia}) = 0,52$ e $p(\text{Grupo} (\text{Cat.}) \times \text{Dia}) = 0,28$, conforme a figura 8.

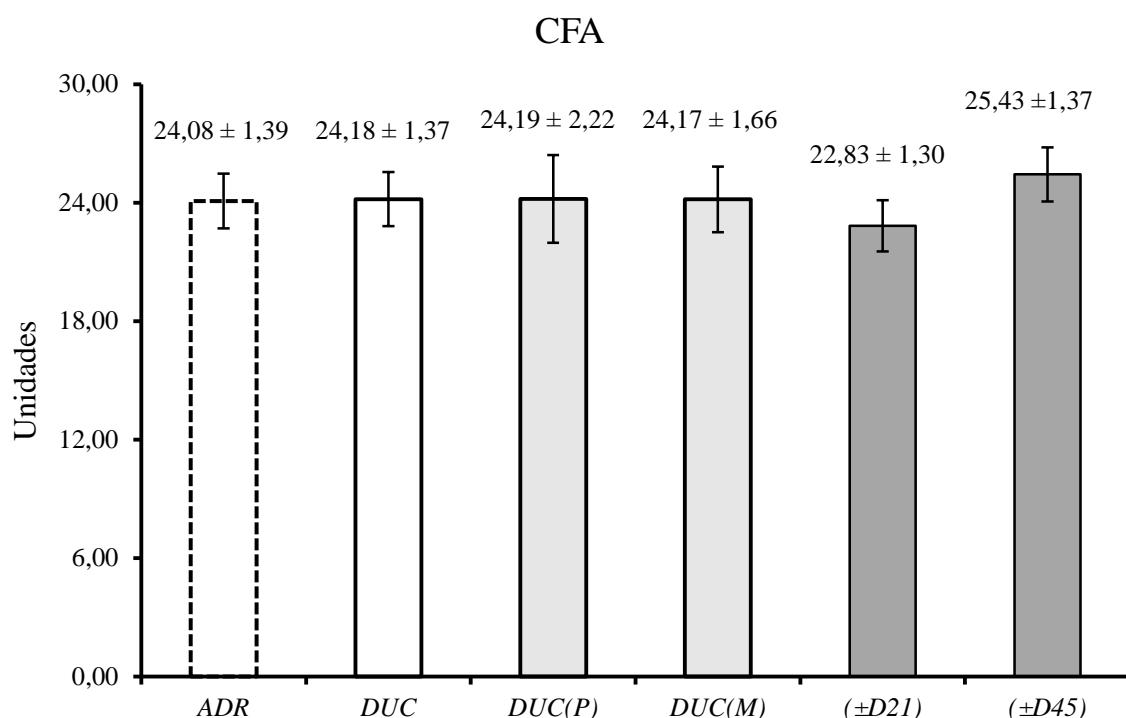


Figura 8. Contagem de folículos antrais (CFA). As comparações foram realizadas entre os grupos: ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto DUC, as categorias primíparas (DUC(P)) e múltíparas (DUC(M)) com doença uterina clínica pós-parto, os dois momentos, em torno de 21 e 45 dias após o parto. Também foram analisadas as interações entre (*Grupo x Dia*) e (*Grupo (Cat.) x Dia*).

Quando categorizamos as populações de folículos, a idade dos animais não afetou as proporções de folículos pequenos (< 4,0 mm), intermediários (entre 4,0 e 8,5 mm) e dominantes (> 8,5 mm), tanto nos ovários direitos quanto nos esquerdos ($p = 0,23$). Demonstrou-se menor e maior proporção de folículos pequenos e intermediários sobre à CFA, respectivamente, em ovários direitos analisados na 2ª avaliação ultrassonográfica que corresponde ao 5º dia do protocolo hormonal para IATF (D45) ($p < 0,01$). Esses resultados possivelmente foram influenciados pelos animais que expressaram doenças uterinas clínicas após o parto, $p(\text{Grupo} \times \text{Dia}) < 0,05$. Nos ovários esquerdos, não foram observadas diferenças sobre a proporção de folículos de nenhuma classe em relação à CFA e nos dois momentos avaliados D21 e D45, conforme a figura 9.

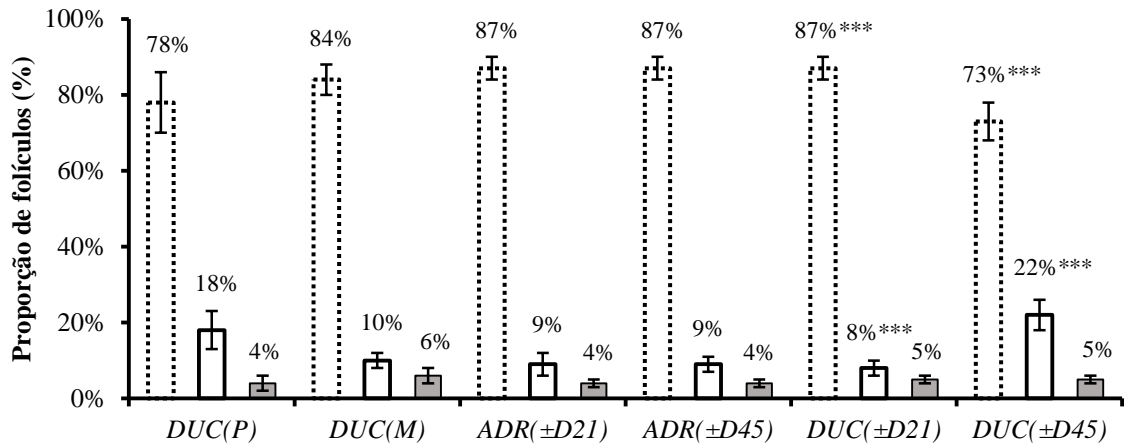
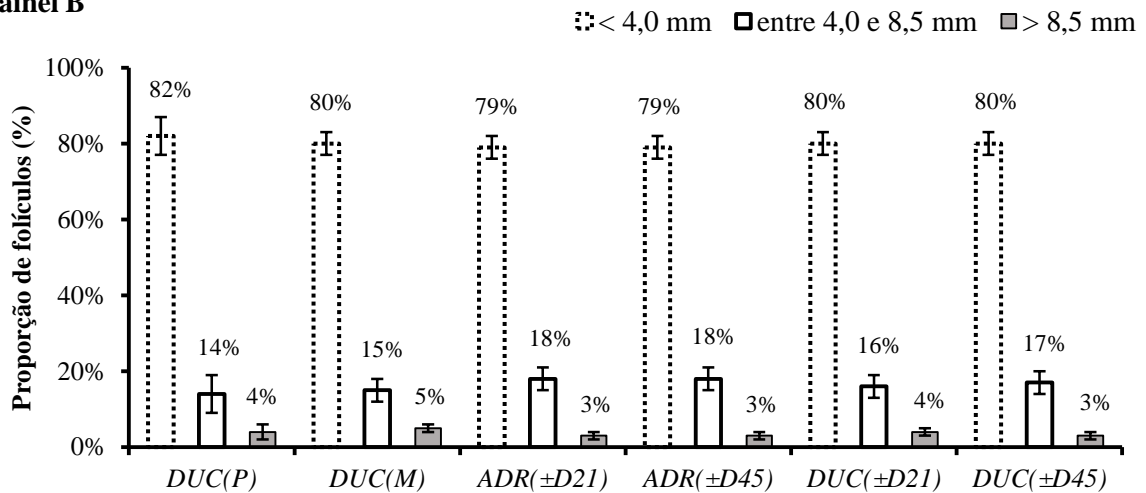
Painel A**Painel B**

Figura 9. Painel A e B – Proporções de folículos pequenos (< 4,0 mm), intermediários (entre 4,0 e 8,5 mm) e dominantes (> 8,5 mm) sobre a contagem de folículos antrais (CFA) nos ovários direitos e esquerdos, respectivamente. As comparações foram realizadas entre: as categorias primíparas (*DUC(P)*) e múltíparas (*DUC(M)*) com doença uterina clínica pós-parto, e os grupos ausência de doença reprodutiva (ADR) e doença uterina clínica pós-parto (DUC) em dois períodos, aproximadamente 21 e 45 dias após o parto. Também foram analisadas as interações entre (*Grupo x Dia*) e (*Grupo (Cat.) x Dia*). *** indica que houve diferenças entre os D21 e D45 para o grupo DUC, $p < 0,01$.

4.7 Biometrias ovarianas

A idade exibiu efeito sobre AO, AOC, VO e VOA. As biometrias ovarianas foram maiores para as vacas estabelecidas no grupo ADR evidenciadas por maiores AO, AOC, VO e VOA em comparação aos animais que exteriorizam doenças uterinas clínicas após o parto.

Primíparas demonstraram menores AO, AOC, VO e VOA em relação a multíparas no tocante ao grupo DUC. Além disso, AO, AOC, VO e VOA dos ovários foram maiores no 2º exame ultrassonográfico dos ovários, quando os animais estavam protocolados para IATF (D45), ($p < 0,05$). Isso pode ser verificado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Área ovariana (AO) e área ovariana corrigida (AOC) obtidas de vacas leiteiras em dois períodos.

Efeito	Área (cm ²) ¹	Valor de p	Área corrigida (cm ²) ²	Valor de p
<i>Idade</i>		< 0,01		0,01
<i>Grupo ADR</i> ³	9,81 ± 0,51	< 0,01	8,88 ± 0,44	< 0,01
<i>Grupo DUC</i> ⁴	7,38 ± 0,38		6,87 ± 0,34	
<i>Grupo DUC-P</i> ⁵	5,98 ± 0,50	< 0,01	5,64 ± 0,45	< 0,01
<i>Grupo DUC-M</i> ⁶	9,11 ± 0,56		8,36 ± 0,49	
<i>(±D21)</i> ⁷	7,79 ± 0,39	0,01	7,00 ± 0,33	< 0,01
<i>(±D45)</i> ⁸	9,30 ± 0,46		8,72 ± 0,42	
<i>Grupo x Dia</i>		0,31		0,31
<i>Grupo (Cat.) x Dia</i>		0,74		0,68

1 – Médias dos mínimos quadrados das áreas dos ovários (cm²): direito + esquerdo. 2 – Médias dos mínimos quadrados das áreas corrigidas (fórmula matemática de uma elipse utilizando comprimento e altura) dos ovários (cm²): direito + esquerdo. 3 – Grupo de animais com ausência de doença reprodutiva. 4 – Grupo de animais com doença uterina clínica pós-parto. 5 – Grupo de primíparas com doença uterina clínica pós-parto. 6 – Grupo de multíparas com doença uterina clínica pós-parto. 7 – Primeira avaliação ovariana realizada por volta dos 21 dias após o parto. 8 – Segunda análise ovariana examinada aproximadamente 45 dias pós-parto.

Tabela 6. Volume ovariano (VO) e volume ovariano ajustado (VOA) obtidos de vacas leiteiras em dois períodos.

Efeito	Volume (cm ³) ¹	Valor de p	Vol. Ajustado (cm ³) ²	Valor de p
<i>Idade</i>		0,01		0,02
<i>Grupo ADR</i> ³	12,15 ± 0,95	< 0,01	9,17 ± 0,71	< 0,01
<i>Grupo DUC</i> ⁴	7,71 ± 0,59		6,28 ± 0,48	
<i>Grupo DUC-P</i> ⁵	5,70 ± 0,71	< 0,01	5,07 ± 0,63	0,01
<i>Grupo DUC-M</i> ⁶	10,44 ± 0,96		7,77 ± 0,70	
<i>(±D21)</i> ⁷	8,00 ± 0,60	< 0,01	6,43 ± 0,47	< 0,01
<i>(±D45)</i> ⁸	11,71 ± 0,87		8,96 ± 0,66	
<i>Grupo x Dia</i>		0,20		0,12
<i>Grupo (Cat.) x Dia</i>		0,64		0,64

1 – Médias dos mínimos quadrados dos volumes ovarianos (cm³) (direito + esquerdo) fornecidos por meio do cálculo matemático de uma forma elipsoide utilizando comprimento (c), altura (h) e largura (l), $V = 0,523 \times (c \times h \times l)$ (ROSENDAHL *et al.*, 2010). 2 – Médias dos mínimos quadrados dos volumes ovarianos ajustados (cm³) (direito + esquerdo). O VOA foi calculado pela fórmula de Rosendahl *et al.* (2010) diminuindo o(s) volume(s) de CL (cm³) e de FD (cm³). Os volumes de CL e de FD foram determinados pela fórmula do volume de uma esfera, $v = 4/3\pi r^3$, onde v = volume em cm³, $\pi = 3,14$ e r = raio (½ diâmetro). 3 – Grupo de animais com ausência de doença reprodutiva. 4 – Grupo de animais com doença uterina clínica pós-parto. 5 – Grupo de primíparas com doença uterina clínica pós-parto. 6 – Grupo de múltiparas com doença uterina clínica pós-parto. 7 – Primeira avaliação ovariana realizada por volta dos 21 dias após o parto. 8 – Segunda análise ovariana examinada aproximadamente 45 dias pós-parto.

Foi observado que as AO e AOC apresentaram tendência a serem maiores para múltiparas com ausências de doenças reprodutivas (ADR-M) em comparação aos animais com múltiplos partos que tiveram doenças uterinas clínicas pós-parto (DUC-M), (p = 0,08). Além disso, constatou-se que os VO e VOA foram maiores para animais do grupo ADR-M em relação aos do grupo DUC-M, (p < 0,05). Isso ocorreu somente na primeira avaliação ultrassonográfica.

No segundo exame reprodutivo, as biometrias ovarianas não diferiram entre os grupos, ($p = 0,41$), conforme as figuras 10 e 11.

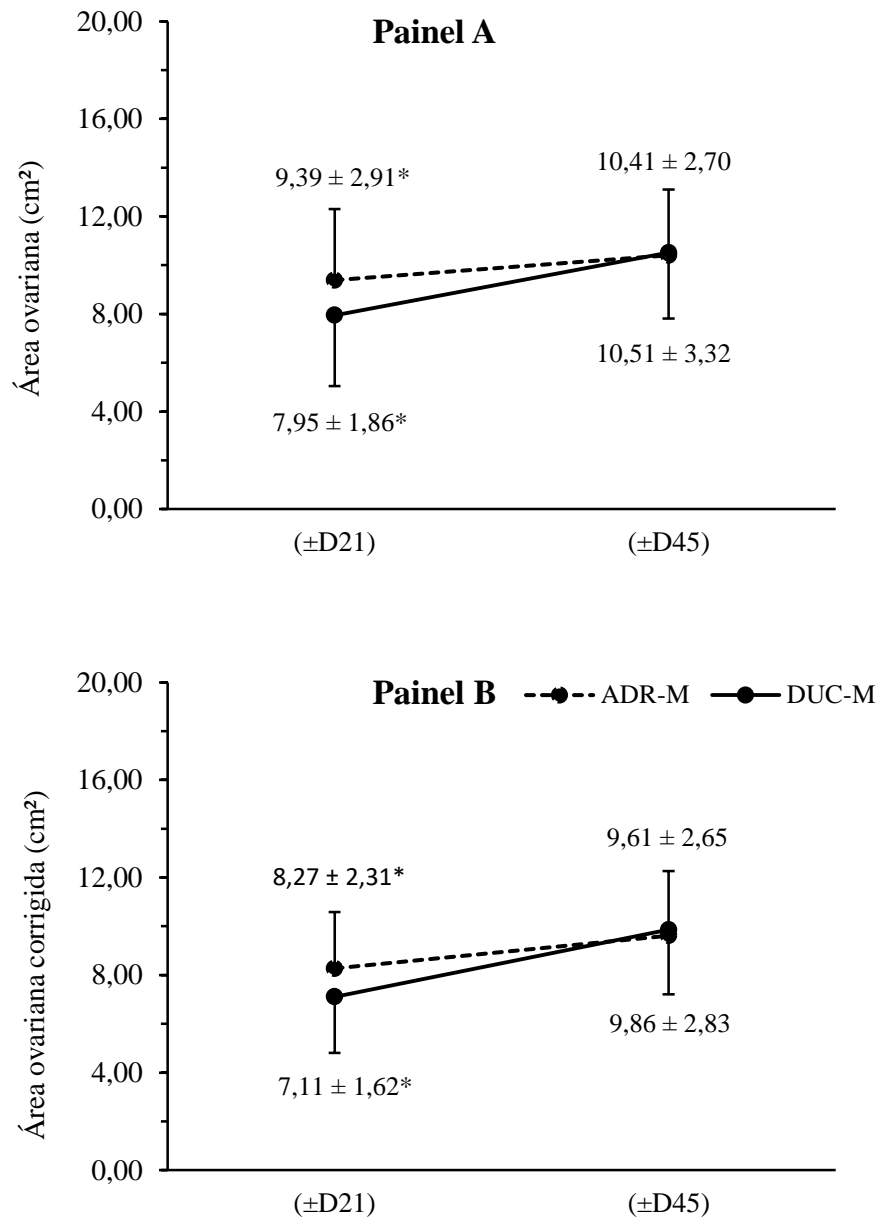


Figura 10. Painéis A e B – Área ovariana (AO) em cm² e área ovariana corrigida (AOC) em cm², respectivamente, em relação aos grupos de múltiparas: com ausência de doença reprodutiva (ADR-M) e com doença uterina clínica pós-parto (DUC-M). Os dados foram coletados por ultrassonografia auxiliada por palpação retal por volta do dia 21 e 45 após o parto. As variáveis foram analisadas e calculadas em laboratório. * indica que houve uma tendência entre os grupos ADR-M e DUC-M, $0,05 \leq p \leq 0,10$.

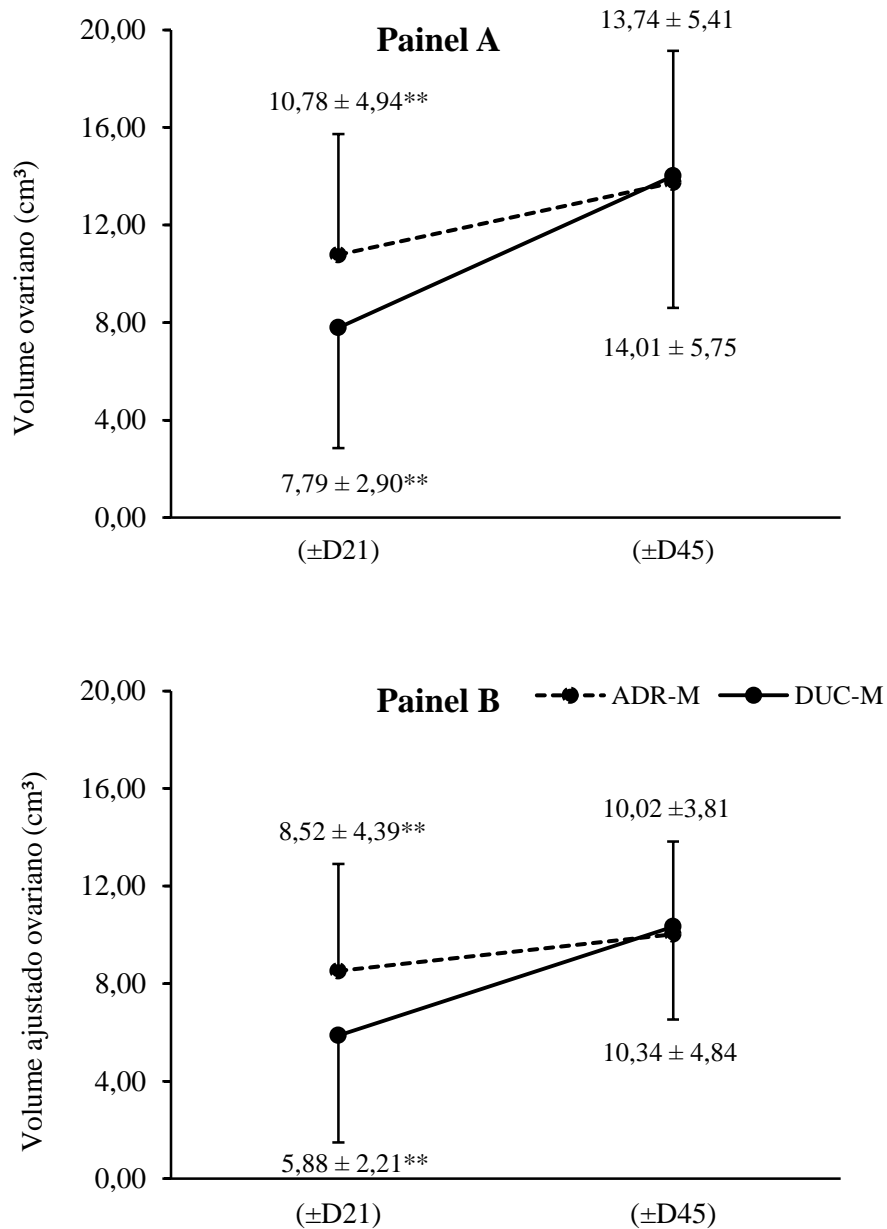


Figura 11. Painéis A e B - Volume ovariano (VO) em cm³ e volume ovariano ajustado (VOA) em cm³, respectivamente, quanto aos grupos de multíparas: com ausência de doença reprodutiva (ADR-M) e com doença uterina clínica pós-parto (DUC-M). Os dados foram coletados por ultrassonografia auxiliada por palpação retal por volta do dia 21 e 45 após o parto. As variáveis foram analisadas e calculadas em laboratório. ** indica que houve diferenças entre os grupos ADR-M e DUC-M, $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As doenças uterinas clínicas pós-parto em vacas leiteiras foram diagnosticadas conforme as alterações dos parâmetros clínicos em associação com o EDV. Assim, vacas com doenças uterinas após o parto tiveram impactos negativos sobre o período de reestabelecimento da atividade ovariana.

Inicialmente, vacas que manifestaram doenças uterinas clínicas passaram por BEPN mais intenso até o fim do PEV em relação aos animais que não exibiram doenças reprodutivas nos primeiros dias após o parto. Isso foi comprovado pela maior perda de ECC nos animais do grupo DUC. Ingvarsen e Moyes, (2013) demonstraram aumento de marcadores metabólicos, indicando BEPN mais severo, em animais que passam por doenças reprodutivas após o parto, corroborando com nossos resultados.

Os animais classificados com DUC, exibiram comprometimento sistêmico, como maior TR ($39,7 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ vs $38,8 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$), menor ECC ($2,90 \pm 0,17$ vs $3,02 \pm 0,23$), menor proporção de animais classificados em relação à P/L como “boa” ou “adequada” (17% vs 100%) e maior proporção de vacas com GD “leve” (61% vs 13%) ou “grave” (28% vs 0) na primeira aferição após o parto, intervalo que corresponde ao de maior incidência da doença uterina clínica em vacas leiteiras. Nossos resultados foram ratificados pelos achados de Leblanc *et al.*, (2011); Sheldon *et al.*, (2006); Stojkov *et al.*, (2015).

A TR e o ECC podem ser variáveis para auxiliar o diagnóstico ou a gravidade das doenças uterinas após o parto de vacas leiteiras. Nos achados de Giuliadori *et al.*, (2013), essas variáveis foram relevantes nas associações com outras ferramentas para o diagnóstico da metrite puerperal e/ou clínica. Vacas com febre, geralmente mostram-se apáticas ou arqueadas (P/L considerada “inadequada” para animais hígidos) e desidratadas (endofalmitia evidente). Nos resultados deste estudo, os animais foram classificados com estado febril, apresentando TR acima de $39,2^{\circ}\text{C}$ de acordo com Sheldon *et al.* em 2006. Wenz *et al.*, (2011) relataram que a TR de vacas com metrite puerperal e/ou clínica atingiu pico no dia do diagnóstico em $39,6 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e foi maior em $0,8^{\circ}\text{C}$, em comparação com vacas saudáveis durante os primeiros 10 dias de DEL o que corroborou com nossos resultados.

O EDV-5, que corresponde ao muco fino, seroso ou aquoso, castanho-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico e fétido (adaptado de MACHADO *et al.*, 2020), foi usado como padrão ouro para diagnóstico de metrite puerperal e/ou clínica nos trabalhos de Giuliadori *et al.*, (2013). Neste estudo, toda vaca que apresentou EDV-5 entre o (D3) e o (D10), geralmente manifestou outro sinal clínico e foi diagnosticada com DUC.

As avaliações utilizadas neste estudo para o exame clínico-reprodutivo nos primeiros 10 dias após o parto (1ª aferição pós-parto) como TR, P/L, GD, associadas ao EDV, podem ter relação com a ocorrência da doença uterina clínica pós-parto em vacas leiteiras.

O grupo de vacas que desenvolveram doenças uterinas clínicas nos primeiros dias após o parto podem apresentar maior probabilidade de ter útero com conteúdo purulento branco amarelado, indicativo de endometrite, aproximadamente aos 21 dias após o parto. Isso foi demonstrado pela maior média de ESU dessas vacas (2,06 vs 1,19), avaliado por exame ultrassonográfico do útero no D21. A existência de muco foi visualizada como pontos hiperecóticos concentrados ou distribuídos difusamente pelo órgão. Contudo, esperava-se a resolução das possíveis doenças uterinas. Segundo relatos de Machado *et al.*, (2020), doenças uterinas clínicas nos primeiros dias após o parto, podem apresentar cura total no máximo em 12 dias após o diagnóstico. Os resultados deste estudo refutam os relatos de Machado *et al.*, (2020), pois a resolução das doenças uterinas clínicas pós-parto está condicionada por fatores inerentes ao ambiente, ao indivíduo e ao agente.

Em estudo de Giuliodoro *et al.* (2013), a incidência de metrite puerperal foi 29,70% e metrite clínica, 9,60%. Neste trabalho, foi identificada incidência de 52,94% de doença uterina clínica, o que pode ter ocorrido por uma série de fatores, visto que as condições dos animais, nutrição, instalações e outras situações que levam a ocorrência de infecções uterinas são várias. Além disso, Giuliodoro *et al.* (2013) relataram que multíparas tiveram menor probabilidade de metrite do que primíparas. Isso foi comprovado neste trabalho, pois todas as primíparas incluídas no experimento desenvolveram doença uterina clínica pós-parto.

A doença uterina pode modificar o intervalo do parto até a primeira ovulação (SHELDON *et al.*, 2002b; WILLIAMS *et al.*, 2007). Em vacas híidas, esse tempo é de 21 a 30 dias (SAVIO *et al.*, 1990a; KAMIMURA *et al.*, 1993; SAKAGUCHI *et al.*, 2004). Neste estudo, confirmou-se que vacas com doenças uterinas clínicas, tiveram menor ECC aferido após o parto, o que confirma um BEPN mais acentuado e, portanto, corrobora com o aumento do intervalo de anestro ratificando os achados de Santos *et al.*, (2009).

Além disso, neste estudo, vacas incluídas no grupo ADR obtiveram maior ocorrência e volume de CL em comparação aos indivíduos que manifestaram doença uterina clínica após o parto, validando as descobertas de Williams *et al.*, (2007) em que animais que não apresentaram doenças reprodutivas após o parto levaram menor tempo para o retorno da atividade cíclica ovariana.

Como observado em nossos achados, primíparas indicaram volumes de CL e FD, bem como biometrias ovarianas, menores em relação a multíparas. Isso corrobora com Jungel e

Smith, (2019) que sugerem que fêmeas bovinas nascem com as reservas foliculares definidas, contudo, seus ovários estão em desenvolvimento até possivelmente a idade adulta e o término da involução uterina macroscópica após o parto, principalmente, referente ao estroma que estabelece suporte para as ovulações conforme sinalização celular direta e indireta, além de fatores de crescimento (KINNEAR *et al.*, 2020).

A reserva folicular é reduzida durante a vida de fêmeas bovinas (WAGNER *et al.*, 2020), o que confirma nossos resultados em que a idade afetou a CFA. Porém, não houve divergência entre a CFA quanto aos animais saudáveis e doentes e aos dias avaliados. A explicação para estes resultados, é que a formação e o desenvolvimento dos ovários e folículos requerem coordenação de múltiplos processos para garantir a presença de oócitos saudáveis e uma arquitetura ovariana funcional. Perturbações em qualquer desses processos podem alterar o potencial reprodutivo da fêmea. Assim, foram identificados vários eventos que podem contribuir para o número e a qualidade dos folículos ovarianos, como proliferação, meiose e apoptose das células germinativas, somente no desenvolvimento fetal dessas fêmeas (JUENGEL e SMITH, 2019). Isso está em contradição com os relatos de Okawa *et al.*, (2021) em que o estado de inflamação durante o período pós-parto inicial pode diminuir as concentrações de AMH e consequentemente a CFA, e posteriormente, afetar o prognóstico reprodutivo de vacas leiteiras. Dessa forma, de acordo com esses achados, é necessária mais investigação acerca da CFA.

A menor e maior frequência de folículos pequenos e intermediários, respectivamente, em ovários direitos, analisados na 2ª avaliação ultrassonográfica que corresponde ao 5º dia do protocolo hormonal para IATF (D45), permite sugerir que os animais ao receberam acetato de buserelina (GnRH) ou BE, mais o implante de P4, cinco dias antes dessa avaliação, que corresponde ao (D0) do protocolo, demonstraram cerca de dois a três dias a emergência de nova onda folicular (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1994).

Os resultados deste estudo possibilitaram sugerir três associações pelos quais as biometrias ovarianas sofrem alterações:

A primeira coincide com a idade ou paridade dos animais. Comprovou-se que primíparas apresentaram menores dimensões dos ovários em comparação a múltíparas.

A segunda, é em relação ao ciclo estral. Células ovarianas proliferam e folículos desenvolvem conforme as fases do ciclo: proestro, estro, metaestro e diestro. Nos achados de Crane e Muirhead (2020), não houve efeito do dia do ciclo estral sobre o cálculo do VOA, que consiste na retirada dos volumes de CL e FD dos VO. Assim, o VOA tende a não diferir do volume ovariano real.

A terceira corresponde ao momento da retomada da atividade ovariana após o parto. Em nossos achados, as comparações em relação aos dois grupos: multíparas que passaram por doenças uterinas com comprometimento sistêmico após o parto (DUC-M) indicaram tendência a menor AO e AOC, e menor de fato quanto ao VO e VOA em relação às multíparas que não manifestaram doenças reprodutivas (ADR-M), no D21.

Os cálculos das AO e AOC utilizam duas dimensões, c e h dos ovários. Sugere-se, perda de exatidão referente ao tamanho ovariano real, pois são dimensões bidimensionais e os ovários são estruturas tridimensionais, o que pode explicar essa tendência em relação aos grupos DUC-M e ADR-M no D21.

Na 2ª análise ultrassonográfica, D45, não foi encontrada diferenças entre as AO, AOC, VO e VOA entre os grupos. Desse modo, propõe que as biometrias são retomadas de acordo com o retorno da ciclicidade ovariana após o parto. Os resultados permitem deduzir que este aumento é responsável pelo estroma ovariano que se desenvolve substancialmente, uma vez que o parênquima não interfere nos cálculos e, a reserva folicular seja perdida com a idade (WAGNER *et al.*, 2020).

Assim, em fêmeas bovinas a ovulação ocorre quando o FD referente a uma onda folicular esteja morfológica e funcionalmente desenvolvido, caso contrário sofre atresia para que uma subsequente onda continue o recrutamento de novos folículos. Assim, de acordo com nossos achados sugere-se uma associação entre as biometrias dos ovários e a dinâmica folicular ovariana após o parto, pois segundo Sakaguchi *et al.*, (2004), o intervalo do parto até a primeira ovulação depende do número de ondas foliculares.

Em síntese, conforme o trabalho de Kinnear *et al.*, (2020), o estroma ovariano é uma área de pesquisa para investigações atuais e futuras, pois é um tecido heterogêneo, complexo e dinâmico. O suporte fornecido pelo estroma é essencial para a manutenção folicular tridimensional e a integração de sinalizações para apoiar a foliculogênese e a dinâmica folicular. Portanto, a evolução da doença uterina clínica impacta de forma negativa sobre a retomada da atividade cíclica, indicada pelo maior intervalo ao retorno das dimensões ovarianas. Logo, o restabelecimento do estroma ovariano é compatível com o aumento das biometrias ovarianas após o parto em vacas leiteiras.

6 CONCLUSÃO

Portanto, o estudo demonstrou que a doença uterina clínica pós-parto impactou de forma negativa sobre a biometria e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana de vacas leiteiras, somente por volta dos 21 dias após o parto.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139-146, 1997.
- AUERSPERG, N.; WONG, A. S.; CHOI, K. C.; KANG, S. K.; LEUNG, P. C. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 255-288, 2001.
- BADDELA, V. S.; SHARMA, A.; VIERGUTZ, T.; KOCZAN, D.; VANSELOW, J. Low oxygen levels induce early luteinization associated changes in bovine granulosa cells. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1066, 2018.
- BAUMGARD, L. H.; COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E. A 100-Year Review: Regulation of nutrient partitioning to support lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10353-10366, 2017.
- BERKHOLTZ, C. B.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Extracellular matrix functions in follicle maturation. In: Seminars in reproductive medicine. **Copyright© by Thieme Medical Publishers, Inc.**, 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., p. 262-269, 2006.
- BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1-2, p. 125-131, 2012.
- BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3105-3124, 2004.
- BONAFOS, L. D.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 43, n. 4, p. 713-721, 1995.
- BRADFORD, B. J.; YUAN, K.; FARNEY, J. K.; MAMEDOVA, L. K.; CARPENTER, A. J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6631-6650, 2015.
- BRILEY, S. M.; JASTI, S.; MCCRACKEN, J. M.; HORNICK, J. E.; FEGLEY, B.; PRITCHARD, M. T.; DUNCAN, F. E. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 152, n. 3, p. 245, 2016.

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 4, p. 98, 1-9, 2013.

BRONZO, V.; LOPREIATO, V.; RIVA, F.; AMADORI, M.; CURONE, G.; ADDIS, M. F.; CREMONESI, P.; MORONI, P.; TREVISI, E.; CASTIGLIONI, B. The role of innate immune response and microbiome in resilience of dairy cattle to disease: the mastitis model. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1397, 2020.

BROWN, H. M.; ROBKER, R. L.; RUSSELL, D. L. Development and hormonal regulation of the ovarian lymphatic vasculature. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5446-5455, 2010.

BROWN, H. M.; RUSSELL, D. L. Blood and lymphatic vasculature in the ovary: development, function and disease. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 29-39, 2014.

BURKHART, M. N.; JUENGEL, J. L.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; GARVERICK, H. A. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 43-54, 2010.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

CARE, A. S.; DIENER, K. R.; JASPER, M. J.; BROWN, H. M.; INGMAN, W. V.; ROBERTSON, S. A. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3472-3487, 2013.

CARLOCK, C.; WU, J.; ZHOU, C.; ROSS, A.; ADAMS, H.; LOU, Y. Ovarian phagocyte subsets and their distinct tissue distribution patterns. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 491-500, 2013.

CARVALHO, M. R.; PEÑAGARICANO, F.; SANTOS, J. E. P.; DEVRIES, T. J.; MCBRIDE, B. W.; RIBEIRO, E. S. Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11701-11717, 2019.

CHACIN, M. F. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. **Theriogenology**, v. 34, n. 6, p. 1169-1184, 1990.

CHASTANT, S.; SAINT-DIZIER, M. Inflammation: friend or foe of bovine reproduction?. **Animal reproduction**, v. 16, p. 539-547, 2019.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4205-4219, 2006.

CHITI, M. C.; DOLMANS, M. -M.; MORTIAUX, L.; ZHUGE, F.; OUNI, E.; SHAHRI, P. A. K.; VAN RUYMBEKE, E.; CHAMPAGNE, S. -D.; DONNEZ, J.; AMORIM, C. A. A novel fibrin-based artificial ovary prototype resembling human ovarian tissue in terms of architecture and rigidity. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, p. 41-48, 2018.

CRANE, M. B.; MUIRHEAD, T. L. Evaluation of ovarian volume by transrectal ultrasonography in cattle; affect of the day of the estrous cycle and validation of a method of subtracting of corpora lutea and follicle volume. **Animal Reproduction Science**, v. 214, p. 106302 (1-7), 2020.

CURRY, T. E.; SMITH, M. F. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. In: Seminars in reproductive medicine. **Copyright© by Thieme Medical Publishers**, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., p. 228-241, 2006.

CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 1971-1980, 2009.

DA SILVA, P.; AITKEN, R. P.; RHIND, S. M.; RACEY, P. A.; WALLACE, J. M. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. **Placenta**, v. 24, n. 2-3, p. 248-257, 2003.

DA SILVA, P.; AITKEN, R. P.; RHIND, S. M.; RACEY, P. A.; WALLACE, J. M. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 123, n. 6, p. 769-777, 2002.

DARWASH, A. O.; LAMMING, G. E.; WOOLLIAMS, J. A. Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1227-1234, 1997a.

DARWASH, A. O.; LAMMING, G. E.; WOOLLIAMS, J. A. The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. **Animal Science**, v. 65, n. 1, p. 9-16, 1997b.

DELIBASI, T.; ERDOGAN, M. F.; SERINSÖZ, E.; KAYGUSUZ, G.; ERDOGAN, G.; SERTÇELİK, A. Ovarian hilus-cell hyperplasia and high serum testosterone in a patient with postmenopausal virilization. **Endocrine Practice**, v. 13, n. 5, p. 472-475, 2007.

DI PIETRO, M.; PASCUALI, N.; PARBORELL, F.; ABRAMOVICH, D. Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome. **Reproduction**, v. 155, n. 5, p. R199-R209, 2018.

DING, X.; LIU, G.; XU, B.; WU, C.; HUI, N.; NI, X.; WANG, J.; DU, M.; TENG, X.; WU, J. Human GV oocytes generated by mitotically active germ cells obtained from follicular aspirates. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28218, 2016.

DO AMARAL, B. C.; CONNOR, E. E.; TAO, S.; HAYEN, J.; BUBOLZ, J.; DAHL, G. E. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, n. 1, p. 38-45, 2010.

DO AMARAL, B. C.; CONNOR, E. E.; TAO, S.; HAYEN, M. J.; BUBOLZ, J. W.; DAHL, G. E. Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 86-96, 2011.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

ERICKSON, G. F.; MAGOFFIN, D. A.; DYER, C. A.; HOFEDITZ, C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. **Endocrine Reviews**, v. 6, n. 3, p. 371-399, 1985.

ETHERINGTON, W. G.; BOSU, W. T.; MARTIN, S. W.; COTE, J. F.; DOIG P. A.; LESLIE, K. E. Reproductive performance in dairy cows following postpartum treatment with gonadotrophin releasing hormone and/or prostaglandin: a field trial. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, n. 3, p. 245-250, 1984.

EVANS, A. C. O.; MOSSA, F.; WALSH, S. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 31-37, 2012.

FAN, X.; BIALECKA, M.; MOUSTAKAS, I.; LAM, E.; TORRENS-JUANEDA, V.; BORGGREVEN, N. V.; TROUW, L.; LOUWE, L. A.; PILGRAM, G. S. K.; MEI, H.; VAN DER WESTERLAKEN, L.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. Single-cell reconstruction of follicular remodeling in the human adult ovary. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3164, 2019.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2695-2703, 1994.

FRAZER, G. S. A rational basis for therapy in the sick postpartum cow. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 523-568, 2005.

GÅFVELS, M.; SELSTAM, G.; DAMBER, J. -E. Influence of oxygen tension and substrates on basal and luteinizing hormone stimulated progesterone production and energy metabolism by isolated corpora lutea of adult pseudopregnant rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 130, n. 3, p. 475-482, 1987.

GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A.; COSCIONI, A. C.; VILLASEÑOR, M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3508-3517, 2004.

GARVERICK, H. A.; JUENGEL, J. L.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; BURKHART, M. N.; PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; MCNATTY, K. P. Development of the ovary and ontogeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) α and β during early fetal life in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 24-33, 2010.

GAUTAM, G.; NAKAO, T.; YAMADA, K.; YOSHIDA, C. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 180-189, 2010.

GILBERT, Robert O. Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 4, p. 3754-3765, 2019.

GIULIODORI, M. J.; MAGNASCO R. P.; BECU-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I. M.; RISCO, C. A.; DE LA SOTA, R. L. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. **Journal Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3621-3631, 2013.

GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 605-614, 2000.

HAILEMARIAM, D.; MANDAL, R.; SALEEM, F.; DUNN, S. M.; WISHART, D. S.; AMETAJ, B. N. Identification of predictive biomarkers of disease state in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2680-2693, 2014.

HARTANTI, M. D.; HUMMITZSCH, K.; BONNER, W. M.; BASTIAN, N. A.; IRVING-RODGERS, H. F.; RODGERS, R. J. Formation of the bovine ovarian surface epithelium during fetal development. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 113-126, 2020.

HENNING, N. F.; LEDUC, R. D.; EVEN, K. A.; LARONDA, M. M. Proteomic analyses of decellularized porcine ovaries identified new matrix proteins and spatial differences across and within ovarian compartments. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20001, 2019.

HORNICK, J. E.; DUNCAN, F. E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. **Human Reproduction**, v. 27, n. 6, p. 1801-1810, 2012.

HORST, R. L.; GOFF, J. P.; REINHARDT, T. A.; BUXTON, D. R. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1269-1280, 1997.

HUMMITZSCH, K.; ANDERSON, R. A.; WILHELM, D.; WU, J.; TELFER, E. E.; RUSSELL, D. L.; ROBERTSON, S. A.; RODGERS, R. J. Stem cells, progenitor cells, and lineage decisions in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 1, p. 65-91, 2015.

HUMMITZSCH, K.; HATZIRODOS, N.; MACPHERSON, A. M.; SCHWARTZ, J.; RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Transcriptome analyses of ovarian stroma: tunica albuginea, interstitium and theca interna. **Reproduction**, v. 157, n. 6, p. 545-565, 2019.

HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; BONNER, W.; SABATIER, L.; REINHARDT, D. P.; SADO, Y.; NINOMIYA, Y.; WILHELM, D.;

RODGERS, R. J. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e55578, 2013.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v. 7, n. s1, p. 112-122, 2013.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br> > Acessado em 20 de Novembro de 2023.

IRELAND, J. J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1648-1658, 2000.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.

IRVING-RODGERS, H. F.; RODGERS, R. J. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. In: Seminars in reproductive medicine. **Copyright© by Thieme Medical Publishers, Inc.**, 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., p. 195-203, 2006.

ISERI, V. J.; KLASING, K. C. Changes in the amount of lysine in protective proteins and immune cells after a systemic response to dead *Escherichia coli*: implications for the nutritional costs of immunity. **Integrative and Comparative Biology**, v. 54, p. 922-930, 2014.

JEON, S. J.; VIEIRA-NETO, A.; GOBIKRUSHANTH, M.; DAETZ, R.; MIN-GOTI, R. D.; PARIZE, A. C. B.; DE FREITAS, S. L.; DA COSTA, A. N. L.; BICALHO, R. C.; LIMA, S.; JEONG, K. C.; GALVÃO, K. N. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6324-6332, 2015.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN, R. J.; FERRIS, T.; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3036-3045, 2015.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 145-150, 2004.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995.

JUENGEL, J. L.; HEATH, D. A.; QUIRKE, L. D.; MCNATTY, K. P. Oestrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 81-92, 2006.

JUENGEL, J. L.; SAWYER, H. R.; SMITH, P. R.; QUIRKE, L. D.; HEATH, D. A.; LUN, S.; MCNATTY, K. P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 1-10, 2002.

JUENGEL, J. L.; SMITH, P. Formation of ovarian follicles in ruminants. **Bioscientifica Proceedings**, v. 8, 2019.

KAMIMURA, S.; OHGI, T.; TAKAHASHI, M.; TSUKAMOTO, T. Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 4, p. 643-647, 1993.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, 2013.

KAWASHIMA, C.; ITO, N.; NAGASHIMA, S.; MATSUI, M.; SAWADA, K.; SCHWEIGERT, F. J.; MIYAMOTO, A.; KIDA, K. Influence of hepatic load from far-off dry period to early postpartum period on the first postpartum ovulation and accompanying subsequent fertility in dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 289-295, 2016.

KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; AMAYA MONTOYA, C.; MATSUI, M.; YAMAGISHI, N.; MATSUNAGA, N.; ISHII, M.; KIDA, K.; MIYAKE Y.; MIYAMOTO, A. Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 479-486, 2006.

KENNGOTT, RA-M.; SCHOLZ, W.; SINOWATZ, Fred. Ultrastructural aspects of the prenatal bovine ovary differentiation with a special focus on the interstitial cells. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 45, n. 5, p. 357-366, 2016.

KINNEAR, H. M.; TOMASZEWSKI, C. E.; CHANG, F. L.; MORAVEK, M. B.; XU, M.; PADMANABHAN, V.; SHIKANOV, A. The ovarian stroma as a new frontier. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. R25-R39, 2020.

LARONDA, M. M.; JAKUS, A. E.; WHELAN, K. A.; WERTHEIM, J. A.; SHAH, R. N.; WOODRUFF, T. K. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. **Biomaterials**, v. 50, p. 20-29, 2015.

LARSEN, M.; LAPIERRE, H.; KRISTENSEN, N. B. Abomasal protein infusion in postpartum transition dairy cows: Effect on performance and mammary metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5608-5622, 2014.

LEA, R. G.; ANDRADE, L. P.; RAE, M. T.; HANNAH, L. T.; KYLE, C. E.; MURRAY, J. F.; RHIND, S. M.; MILLER, D. W. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 113-124, 2006.

LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 54-63, 2014.

LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1610-1618, 2011.

LEI, L.; SPRADLING, A. C. Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8585-8590, 2013.

LEWIS, G. S. Uterine health and disorders. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 5, p. 984-994, 1997.

LIND, A.-K.; WEIJDEGÅRD, B.; DAHM-KÄHLER, P.; MÖLNE, J.; SUNDFELDT, K.; BRÄNNSTRÖM, M. Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 85, n. 12, p. 1476-1484, 2006.

LIU, C.; PENG, J.; MATZUK, M. M.; YAO, H. H. C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6934, 2015.

LIU, R.; ZHANG, X.; FAN, Z.; WANG, Y.; YAO, G.; WAN, X.; LIU, Z.; YANG, B.; YU, L. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

LOGAN, A.; HILL, D. J. Bioavailability: Is this a key event in regulating the actions of peptide growth factors?. **Journal of Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 157-161, 1992.

LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 31-39, 2008.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction (Cambridge, England). Supplement**, v. 61, p. 415-427, 2003.

LUCY, M. C.; VERKERK, G. A.; WHYTE, B. E.; MACDONALD, K. A.; BURTON, L.; CURSONS, R. T.; ROCHE, J. R.; HOLMES, C. W. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 526-539, 2009.

MACHADO, V. S.; CELESTINO, M. L.; OLIVEIRA, E. B.; LIMA, F. S.; BALLOU, M. A.; GALVÃO, K. N. The association of cow-related factors assessed at metritis diagnosis with metritis cure risk, reproductive performance, milk yield, and culling for untreated and ceftiofur-treated dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 9261-9276, 2020.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3-4, p. 171-180, 2000.

MARTINEZ, M. F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; JUENGEL, J. L. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 466-475, 2016.

MATOUSEK, M.; CARATI, C.; GANNON, B.; BRANNSTROM, M. Novel method for intrafollicular pressure measurements in the rat ovary: increased intrafollicular pressure after hCG stimulation. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 307-314, 2001.

MCARTHUR, M. E.; IRVING-RODGERS, H. F.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 913-924, 2000.

MCCOY, M. A.; LENNOX, S. D.; MAYNE, C. S.; MCCAUGHEY, W. J.; EDGAR, H. W. J.; CATNEY, D. C.; VERNER, M.; MACKAY, D. R.; GORDON, A. W. Milk progesterone profiles and their relationship with fertility, production and disease in dairy cows in Northern Ireland. **Animal Science**, v. 82, n. 2, p. 213-222, 2006.

MCDOUGALL, S.; BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; WILLIAMSON, N. B. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 3, p. 212-216, 1995.

MCKEY, J.; BUNCE, C.; BATCHVAROV, I. S.; ORNITZ, D. M.; CAPEL, B. Neural crest-derived neurons invade the ovary but not the testis during mouse gonad development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 12, p. 5570-5575, 2019.

MCINTUSH, E. W.; SMITH, M. F. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 1998.

MEIKLE, A.; KULCSAR, M.; CHILLIARD, Y.; FEBEL, H.; DELAVAUD, C.; CAVESTANY, D.; CHILIBROSTE, P. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 727-737, 2004.

MESCHER, A. L. Epithelial tissue. **New York, NY: McGraw-Hill Education**, 2018.

MEZZETTI, M.; MINUTI, A.; PICCIOLI-CAPPELLI, F.; TREVISI, E. Inflammatory status and metabolic changes at dry-off in high-yield dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 51-65, 2020.

MONNIAUX, D.; HUET-CALDERWOOD, C.; LE BELLEGO, F.; FABRE, S.; MONGET, P.; CALDERWOOD, D. A. Integrins in the ovary. In: *Seminars in Reproductive Medicine*. Copyright© by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., p. 251-261, 2006.

MORK, L.; MAATOUK, D. M.; MCMAHON, J. A.; GUO, J. J.; ZHANG, P.; MCMAHON, A. P.; CAPEL, B. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 37, 1-9, 2012.

MOSSA, F.; CARTER, F.; WALSH, S. W.; KENNY, D. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. L. H.; HILDEBRANDT, T. B.; LONERGAN, P.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 4, p. 92, 1-9, 2013.

MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; SMITH, G.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. **Reproduction**, v. 140, p. 713-720, 2010.

MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2355-2361, 2012.

MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 3-9, 2008.

MULLIGAN, F. J.; O'GRADY, L.; RICE, D. A.; DOHERTY, M. L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3-4, p. 331-353, 2006.

MURASAWA, M.; TAKAHASHI, T.; NISHIMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 5, p. 689-693, 2005.

MURDOCH, W. J.; VAN KIRK, E. A.; VONNAHME, K. A.; FORD, S. P. Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-8, 2003.

NARDO, L. G.; BUCKETT, W. M.; WHITE, D.; DIGESU, A. G.; FRANKS, S.; KHULLAR, V. Three-dimensional assessment of ultrasound features in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovarian syndrome (PCOS): ovarian stromal volume does not correlate with biochemical indices. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1052-1055, 2002.

NEILSON, D.; SEEGAR JONES, G.; WOODRUFF, J. D.; GOLDBERG, B. The innervation of the ovary. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 25, n. 10, p. 889-904, 1970.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 313, n. 1-2, p. 9-16, 2009.

NORMAN, R. J.; BRANNSTROM, M. White cells and the ovary—incidental invaders or essential effectors?. **Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 333-336, 1994.

OKAMURA, H.; TAKENAKA, A.; YAJIMA, Y.; NISHIMURA, T. Ovulatory changes in the wall at the apex of the human Graafian follicle. **Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 153-155, 1980.

OKAWA, H.; MONNIAUX, D.; MIZOKAMI, C.; FUJIKURA, A.; TAKANO, T.; SATO, S.; SHINYA, U.; KAWASHIMA, C.; YAMOTO, O.; FUSHIMI, Y.; VOS, P. L. A. M.; TANIGUCHI, M.; TAKAGI, M. Association between anti-Müllerian hormone concentration and inflammation markers in serum during the peripartum period in dairy cows. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1241, 2021.

OPSOMER, G.; GRÖHN, Y. T.; HERTL J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 841-857, 2000.

OUNI, E.; VERTOMMEN, D.; CHITI, M. C.; DOLMANS, M. M.; AMORIM, C. A. A draft map of the human ovarian proteome for tissue engineering and clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, p. S159-S173, 2019.

PADMANABHAN, V.; SMITH, P.; VEIGA-LOPEZ, A. Developmental programming: impact of prenatal testosterone treatment and postnatal obesity on ovarian follicular dynamics. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, n. 4, p. 276-286, 2012.

PASCOTTINI, O. B.; LEBLANC, S. J. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. **Theriogenology**, v. 150, p. 193-200, 2020.

PEPE, G.; LOCATI, M.; DELLA TORRE, S.; MORNATA, F.; CIGNARELLA, A.; MAGGI, A.; VEGETO, E. The estrogen–macrophage interplay in the homeostasis of the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 6, p. 652-672, 2018.

PRYCE, J. E.; ROYAL, M. D.; GARNSWORTHY, P. C.; MAO, I. L. Fertility in the high-producing dairy cow. **Livestock Production Science**, v. 86, n. 1-3, p. 125-135, 2004.

RAJAMAHENDRAN, R.; TAYLOR, C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. **Animal Reproduction Science**, v. 22, n. 3, p. 171-180, 1990.

REEVES, G. Specific Stroma in the Cortex and Medulla of the Ovary: Cell Types and Vascular Supply in Relation to Follicular Apparatus and Ovulation. **Obstetrics & Gynecology**, v. 37, n. 6, p. 832-844, 1971.

RIBEIRO, E. S.; BISINOTTO, R. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; MORRISON, A.; KUMAR, A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6888-6900, 2014.

RIBEIRO, E. S.; CARVALHO, M. R. Impact and mechanisms of inflammatory diseases on embryonic development and fertility in cattle. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 3, p. 589-600, 2017.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DE CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZÉ, J. L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; REMY, B.; BECKERS, J. F.; MONNIAUX, D. Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology Reproduction**, v. 80, n. 1, p. 50-59, 2009.

ROCHE, J. F.; MACKEY, D.; DISKIN, M. D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 703-712, 2000.

ROCHE, J. R.; BELL, A. W.; OVERTON, T. R.; LOOR, J. J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century—a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science**, v. 53, n. 9, p. 1000-1023, 2013.

ROCHE, J. R.; LEE, J. M.; MACDONALD, K. A.; BERRY, D. P. Relationships among body condition score, body weight, and milk production variables in pasture-based dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3802-3815, 2007.

RODGERS, R. J.; LAVRANOS, T. C.; VAN WEZEL, I. L.; IRVING-RODGERS, H. F. Development of the ovarian follicular epithelium. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 151, n. 1-2, p. 171-179, 1999.

ROLAKI, A.; DRAKAKIS, P.; MILLINGOS, S.; LOUTRADIS, D.; MAKRIGIANNAKIS, A. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 1, p. 93-103, 2005.

ROSENDAHL, M.; ERNST, E.; RASMUSSEN, P. E.; ANDERSEN, C. Y. True ovarian volume is underestimated by two-dimensional transvaginal ultrasound measurement. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 995-998, 2010.

ROTGERS, E.; JØRGENSEN, A.; YAO, H. H. -C. At the crossroads of fate-somatic cell lineage specification in the fetal gonad. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 5, p. 739-759, 2018.

ROWLEY, J. E.; AMARGANT, F.; ZHOU, L. T.; GALLIGOS, A.; SIMON, L. E.; PRITCHARD, M. T.; DUNCAN, F. E. Low molecular weight hyaluronan induces an inflammatory response in ovarian stromal cells and impairs gamete development in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1036, 2020.

ROYAL, M. D.; DARWASH, A. O.; FLINT, A. P. F.; WEEB, R.; WOOLLIAMS, J. A.; LAMMING, G. E. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Animal Science**, v. 70, n. 3, p. 487-501, 2000.

SAKAGUCHI, M.; SASAMOTO, Y.; SUZUKI, T.; TAKAHASHI, Y.; YAMADA, Y. Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2114-2121, 2004.

SANTOS, J. E. P.; RUTIGLIANO, H. M.; SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 3-4, p. 207-221, 2009.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; HYNES, N.; ROCHE, J. F. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. **Reproduction**, v. 88, n. 2, p. 569-579, 1990a.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. **Reproduction**, v. 88, n. 2, p. 581-591, 1990b.

SAWYER, H. R.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1134-1150, 2002.

SCARAMUZZI, R. J.; BROWN, H. M.; DUPONT, J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 32-41, 2010.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, p. 361-384, 2019.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; HEALEY G. D.; GABLER, C.; HEUWIESER, W.; STREYL, D.; BROMFIELD, J. J.; MIYAMOTO, A.; FERGANI, C.; DOBSON, H. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, v. 148, n. 3, p. R41-R51, 2014.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-1530, 2006.

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, n. 2, p. 266-271, 2002a.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; PFEIFFER, D. U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 123, n. 6, p. 837-845, 2002b.

SHELDON, I. M.; OWENS, S. -E.; TURNER, M. L. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 67-73, 2017.

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, s. 3, p. 1-9, 2009.

SHELDON, I. M.; WILLIAMS E. J.; MILLER, A. N.; NASH D. M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115-121, 2008.

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 227-243, 2004.

SILVEIRA, P. A.; SPOON, R. A.; RYAN, D. P.; WILLIAMS, G. L. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1338-1346, 1993.

SILVEIRA, P. A. S.; BUTLER, W. R.; DA SILVA, T. C.; BARROS, C. C.; CORRÊA, M. N.; SCHNEIDER, A. Association of polymorphisms in the IGF-I, GHR and STAT5A genes with

serum IGF-I concentration and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 211, p. 106206, 2019.

SIU, M. K.; CHENG, C. Y. The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. **Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers**, p. 186-192, 2012.

SMITH, M. C. A.; WALLACE, J. M. Influence of early post partum ovulation on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 2, p. 207-216, 1998.

SMITH, P.; STECKLER, T. L.; VEIGA-LOPEZ, A.; PADMANABHAN, V. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 4, p. 726-736, 2009.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267-278, 2013.

STANGAFERRO, M. L.; WIJMA, R.; CAIXETA, L. S.; AL-ABRI, M. A.; GIORDANO, J. O. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part III. Metritis. **Journal Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7422-7433, 2016.

STOJKOV, J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; MARCHANT-FORDE, J. N.; WEARY D. M. Assessment of visceral pain associated with metritis in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5352-5361., 2015.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; TAKAYA, R.; FUKAYA T.; YAJIMA, A.; DATE, F.; NAGURA, H. Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 8, p. 2186-2191, 1998.

SVINGEN, T.; FRANÇOIS, M.; WILHELM, D.; KOOPMAN, P. Three-dimensional imaging of Prox1-EGFP transgenic mouse gonads reveals divergent modes of lymphangiogenesis in the testis and ovary. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e52620, 2012.

TANAKA, T.; ARAI, M.; OHTANI, S.; UEMURA, S.; KUROIWA, T.; KIM, S.; KAMOMAE, H. Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1-2, p. 134-143, 2008.

THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 5, p. 608-610, 1973.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.

THOMPSON, I. M.; DAHL, G. E. Dry-period seasonal effects on the subsequent lactation. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 6, p. 628-631, 2012.

TINGEN, C. M.; KIESEWETTER, S. E.; JOZEFIK, J.; THOMAS, C.; TAGLER, D.; SHEA, L.; WOODRUFF, T. K. A macrophage and theca cell-enriched stromal cell population

influences growth and survival of immature murine follicles in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 141, n. 6, p. 809, 2011.

TURNER, E. C.; HUGHES, J.; WILSON, H.; CLAY, M.; MYLONAS, K. J.; KIPARI, T.; DUNCAN, W. C.; FRASER, H. M. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. **Reproduction**, v. 141, n. 6, p. 821-831, 2011.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; PROULX, J. G.; DUFOUR, J. J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 7, p. 1796-1805, 1994.

UCHIDA, S. Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. **Autonomic Neuroscience**, v. 187, p. 27-35, 2015.

VELÁZQUEZ, M. M. L.; PERALTA, M. B.; ANGELI, E.; STASSI, A. F.; GAREIS, N. C.; DURANTE, L.; CAINELLI, S.; SALVETTI, N. R.; REY, F.; ORTEGA, H. H. Immune status during postpartum, peri-implantation and early pregnancy in cattle: An updated view. **Animal Reproduction Science**, v. 206, p. 1-10, 2019.

VERNON, R. G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 460-469, 2005.

WAGNER, M.; YOSHIHARA, M.; DOUAGI, I.; DAMDIMOPOULOS, A.; PANULA, S.; PETROPOULOS, S.; LU, H.; PETTERSSON, K.; PALM, K.; KATAYAMA, S.; HOVATTA, O.; KERE, J.; LANNER, F.; DAMDIMOPOULOU, P. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1147, 2020.

WANG, S.; ZHENG, Y.; LI, J.; YU, Y.; ZHANG, W.; SONG, M.; LIU, Z.; MIN, Z.; HU, H.; JING, Y.; HE, X.; SUN, L.; MA, L.; ESTEBAN, C. R.; CHAN, P.; QIAO, J.; ZHOU, Q.; BELMONTE, J. C. I.; QU, J.; TANG, F.; LIU, G. -H. Single-cell transcriptomic atlas of primate ovarian aging. **Cell**, v. 180, n. 3, p. 585-600. e19, 2020.

WATHES, D. C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D. G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p. S232-S241, 2007.

WEBB, R. P. C. G.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68, p. S22-S29, 2007.

WEBB, R. P. C. G.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. suppl_13, p. E63-E74, 2004.

WENZ, J. R.; MOORE, D. A.; KASIMANICKAM, R. Factors associated with the rectal temperature of Holstein dairy cows during the first 10 days in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1864-1872, 2011.

WENZEL, J. G.; ODEND'HAL, S. The mammalian rete ovarii: a literature review. **The Cornell Veterinarian**, v. 75, n. 3, p. 411-425, 1985.

WEST, E. R.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4439-4448, 2007.

WEST-FARRELL, E. R.; XU, M.; GOMBERG, M. A.; CHOW, Y. H.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. The mouse follicle microenvironment regulates antrum formation and steroid production: alterations in gene expression profiles. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 3, p. 432-439, 2009.

WILLIAMS, C. Y.; HARRIS T. G.; BATTAGLIA, D. F.; VIGUIÉ, C.; KARSCH, F. J. Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 142, n. 5, p. 1915-1922, 2001.

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, n. 4, p. 549-559, 2007.

WITTROCK, J. M.; PROUDFOOT, K. L.; WEARY, D. M.; VON KEYSER-LINGK, M. A. Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2408-2412, 2011.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 32-38, 2019.

WU, R.; VAN DER HOEK, K. H.; RYAN, N. K.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. Macrophage contributions to ovarian function. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 2, p. 119-133, 2004.

WU, C.; XU, B.; LI, X.; MA, W.; ZHANG, P.; CHEN, X.; WU, J. Tracing and characterizing the development of transplanted female germline stem cells in vivo. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 6, p. 1408-1419, 2017.

XU, J.; ZHENG, T.; HONG, W.; YE, H.; HU, C.; ZHENG, Y. Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 214-232, 2018.

YOUNG, B.; O'DOWD, G.; WOODFORD, P. Cell Structure and Function. **Philadelphia: Churchill Livingstone**, 2014.

ZARATE-GARCIA, L.; LANE, S. I.; MERRIMAN, J. A.; JONES, K. T. FACS-sorted putative oogonial stem cells from the ovary are neither DDX4-positive nor germ cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27991, 2016.

ZHANG, Z.; SCHLAMP, F.; HUANG, L.; CLARK, H.; BRAYBOY, L. Inflammaging is associated with shifted macrophage ontogeny and polarization in the aging mouse ovary. **Reproduction**, v. 159, n. 3, p. 325-337, 2020.

ZHANG, H.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; ADHIKARI, D.; UENO, H.; LIU, K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12580-12585, 2012.

ZHOU, Z.; LOOR, J. J.; PICCIOLI-CAPPELLI, F.; LIBRANDI, F.; LOBLEY, G. E.; TREVISI, E. Circulating amino acids in blood plasma during the periparturient period in dairy cows with different liver functionality index. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2257-2267, 2016.