

# Dinâmica do período periparto e subsequente impacto na fertilidade

W.W. Thatcher<sup>1</sup>, F. Silvestre<sup>1</sup>, C. Risco<sup>2</sup>, E. Benzaquen<sup>2</sup>, C.R. Staples<sup>1</sup>, F.M Cullens<sup>1</sup> J.A. Hernandez<sup>2</sup> e E.J. Garbarino<sup>2</sup>

Department of Animal Sciences, IFAS e <sup>2</sup>Department of LACS, CVM, University of Florida, Gainesville, 32611-0920

## Introdução

A restauração da função ovariana é um processo multifatorial que envolve a coordenação entre o hipotálamo e o eixo hipofisário-ovariano e uterino. A parição do bezerro e a eliminação das membranas fetais provocam uma queda abrupta nas concentrações plasmáticas de progesterona, estrógenos e corticosteróides. A recuperação da competência reprodutiva no período pós-parto é provavelmente um grande fator limitante ao sucesso de programas subsequentes de manejo reprodutivo voltados à inseminação logo no início do período voluntário de espera. O manejo da vaca no periparto e no pós-parto requer a integração de programas reprodutivos-nutricionais e de sanidade do rebanho.

## Periparto e Pós-Parto

### *Alterações hormonais no periparto:*

O status endócrino da vaca leiteira é significativamente alterado durante a gestação por uma série de hormônios específicos da prenhez que inibem a secreção de FSH e de LH pela hipófise. A progesterona e as concentrações cada vez mais elevadas de estrógenos (estrone, estradiol e sulfato de estrone) aliadas a hormônios placentários mamogênicos favorecem o crescimento das glândulas mamárias. A iminente maturação e chegada do feto provocam alterações hormonais dinâmicas que atingem o ponto máximo ao parto e no início da lactação (Thatcher et al., 1980). Nas duas últimas semanas de gestação, as concentrações de progesterona caem gradativamente, acompanhando aumentos nos níveis de estradiol e de estrone livre produzidos por placentomas da placenta. As altas concentrações de estrógenos livres e as concentrações inferiores de progesterona aumentam a prolactina, em um processo fundamental ao início da secreção de leite (lactogênese). A última queda abrupta na progesterona está associada à maior secreção de PGF<sub>2α</sub> da placenta. O bloqueio de progesterona da prenhez é suspenso e a boa resposta do útero à oxitocina leva à parição. Com a parição e a eliminação das membranas fetais ocorre redução dos níveis de estrógeno, permitindo que a vaca se recupere dos efeitos estrogênicos de feedback negativo da prenhez e possa secretar FSH e LH no início do período pós-parto. A secreção de PGF<sub>2α</sub> prossegue no pós-parto, uma vez que a principal área de secreção é a carúncula uterina materna não eliminada com a placenta nas primeiras 24 horas após o parto (Guilbault et al. 1984a,b). Há uma queda nas concentrações plasmáticas de 13,14-diidro-15-ceto PGF<sub>2α</sub> (PGFM) à medida que o útero reduz de tamanho e volta a apresentar baixas

concentrações basais até aproximadamente 14 dias após o parto. As concentrações de PGFM estão altamente relacionadas à taxa de produção uterina nessa fase. Altas concentrações basais de PGFM além desse período estão associadas a infecções uterinas localizadas. Tais alterações hormonais sincronizadas levam a uma prenhez bem-sucedida, com a parição de um bezerro que recebe imediatamente nutrientes e imunoglobulinas pelo colostro/leite. Do ponto de vista da vaca, o periparto é um período de transição delicada devido à menor ingestão alimentar na pré-parição associada a aumentos nos níveis de estradiol e provoca uma grande mobilização de nutrientes do tecido adiposo para atender a necessidades energéticas subseqüentes para a lactação. Essa delicada transição hormonal é influenciada pelo estresse da própria parição.

#### *Restauração da Atividade Ovariana e do Status Energético no Pós-Parto:*

A vaca leiteira possui uma capacidade surpreendente de restabelecer a atividade folicular na fase inicial do pós-parto. A queda nas concentrações plasmáticas de estradiol após a parição e a eliminação das membranas fetais interrompe a inibição da secreção de FSH e os primeiros aumentos no FSH plasmático começam a estimular o desenvolvimento de folículos já no 7º dia após a parição. O folículo dominante se desenvolve em resposta ao FSH; entretanto, o folículo não produz estradiol e tal fato parece estar relacionado a quantidades inadequadas de LH plasmático (Beam e Butler, 1987; Beam e Butler, 1988). A baixa frequência de pulsos de LH compromete a disponibilidade de LH necessária à manutenção do crescimento do folículo, provocando a regressão do mesmo. Além disso, esta fase pode estar caracterizada por quantidades inadequadas de IGF-I secretadas para favorecer a sinergia com LH. Tanto LH quanto IGF-I são necessários ao desenvolvimento funcional completo de um folículo estrogênico. O laboratório do Dr. Ron Butler, na Cornell University, demonstrou que a vaca parece perceber seu balanço energético de tal forma que, ao atingir o ponto mais negativo (nadir) no status energético, e começa a apresentar aumento no status energético (ainda negativo), a secreção de LH também aumenta, conforme caracterizado pela maior frequência de pulsos de LH (Butler e Smith, 1989; Canfield e Butler 1990). Conseqüentemente, a próxima onda folicular induzida por FSH gera um folículo dominante que continua se desenvolvendo em resposta à maior disponibilidade de LH, produzindo estradiol. Agora a vaca desenvolve uma resposta de feedback positivo ao estradiol e induz um pico pré-ovulatório de LH que promove a ovulação. Não é rara a primeira ovulação ocorrer já aos 14 dias do pós-parto. Em muitos casos, a primeira ovulação não está associada ao estro e o ciclo de vida do CL é reduzido entre 6 e 10 dias. A fase inicial das primeiras ovulações costuma ocorrer no ovário contralateral ao corno uterino da gestação anterior. Após a regressão total do útero (cerca de 30 dias após o parto), a frequência de ovulações posteriores volta à normalidade com uma taxa levemente superior de aproximadamente 55% no ovário direito. Fica claro que a restauração da atividade normal do folículo e do CL é altamente controlada.

No pós-parto, as vacas leiteiras sofrem alterações marcantes no status energético antes de restabelecerem a função normal dos ciclos ovarianos. O status energético foi definido como o consumo de energia líquida do animal descontando-se tanto a energia líquida exigida para a manutenção quanto a energia líquida necessária à produção de leite. Os bovinos de leite passam por um período de status energético negativo na fase inicial da lactação, uma vez que a produção de energia associada à produção de leite ultrapassa a energia obtida pelo consumo de ração. O status energético negativo está associado a determinados perfis de metabólitos e hormônios no

sangue. A função reprodutiva pós-parição pode ser dividida entre a recrudescência da atividade dos folículos ovarianos, a indução de um pico espontâneo de LH que induz a ovulação e a formação de corpos lúteos totalmente funcionais que manterão a prenhez.

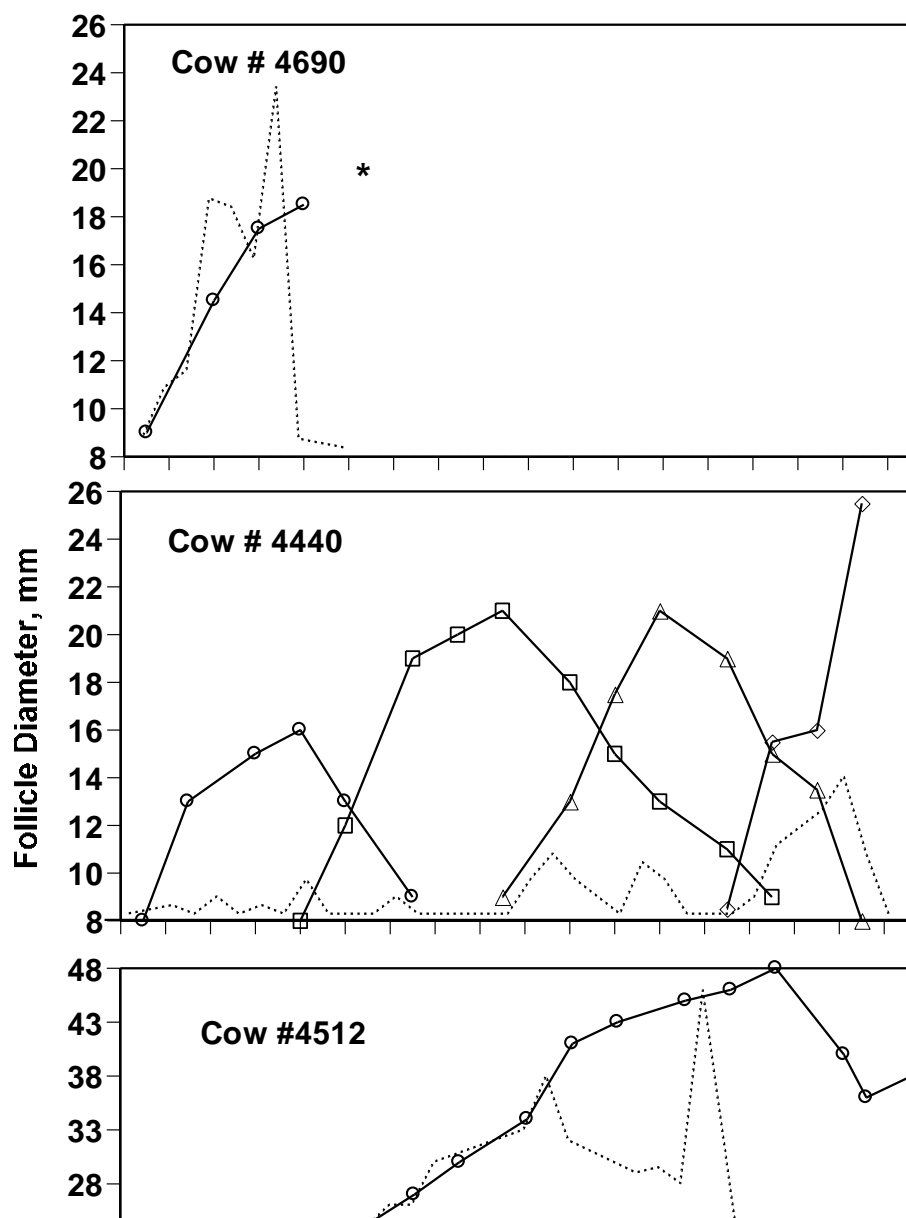
O efeito do status energético na atividade ovariana integrada na fase inicial da lactação foi avaliado pelo exame dos perfis de progesterona plasmática de 54 vacas holandesas multíparas (Staples et al., 1990). Vinte e oito por cento das vacas (n=15) estavam em anestro (sem ciclos ovarianos) no período de 9 semanas pós-parição com base nas concentrações plasmáticas de  $P_4$  (<1 ng/ml). Essas vacas foram comparadas a dois grupos que estavam ciclando: um grupo composto por 25 vacas com atividade do corpo lúteo (CL) no período de 40 dias após a parição e um segundo grupo, de 14 vacas, com atividade do CL entre 40 e 63 dias do pós-parto. O status energético nas 2 primeiras semanas do pós-parto foi bastante significativo. Tanto as vacas que ciclaram mais tarde quanto as acíclicas apresentaram status energético negativo progressivo, ou seja, continuaram expressando um status energético mais negativo na segunda semana em comparação à primeira semana, principalmente no caso das vacas em anestro. O consumo alimentar das vacas em anestro foi continuamente inferior ao das vacas que estavam ciclando. Além de ingerirem menos na primeira semana pós-parto, à medida que o tempo passava a diferença entre a ingestão das vacas em anestro e a das que ciclavam aumentava cada vez mais. Em média, as vacas em anestro consumiram 2,5 a 3,6 kg menos ração por dia em relação às que ciclavam. As vacas que restabeleceram mais rapidamente a atividade do CL começaram a recuperar o status energético positivo imediatamente após a primeira semana. Um dado interessante foi a maior produção de leite nas vacas que ciclaram mais cedo. A recuperação do status energético positivo parece ser importante ao início do estro. As concentrações plasmáticas de IGF-I estiveram intimamente relacionadas à recrudescência da atividade do CL nos três grupos (Thatcher et al., 1996). As vacas que ciclaram mais cedo no pós-parto expressaram um aumento precoce nas concentrações de IGF-I (2 semanas pós-parto), enquanto as vacas em anestro até a 8<sup>a</sup>. semana de lactação não aumentaram as concentrações plasmáticas de IGF-I até a 5<sup>a</sup>. ou 6<sup>a</sup>. semana após o parto. As vacas que começaram a ciclar no período de 40 a 63 dias pós-parição apresentaram um padrão intermediário nas concentrações plasmáticas de IGF-I. Presumimos que tais alterações nos níveis de IGF-I estejam relacionadas a diferenças metabólicas entre as vacas que começaram a ciclar em momentos diferentes e foram fundamentais ao desenvolvimento folicular e à conseqüente formação do CL. O déficit significativo no status energético inicial das vacas em anestro exerceu um efeito *carryover* na concepção. No final, a concepção ocorreu em apenas 33% (5/15) das vacas em anestro em comparação a 84% (21/25) e 93% (13/14) em vacas com ciclicidade precoce e tardia, respectivamente.

A recuperação do status energético diário do ponto mais negativo parece ser um sinal importante do início da atividade ovariana. Na realidade, a relação em vacas leiteiras em lactação entre os dias até a primeira ovulação pós-parto (Y) e o intervalo (em dias) do ponto mais negativo até a ovulação (X) é descrita pela seguinte regressão linear: ( $R^2 = 0,77$ ),  $Y = 10,3 + 1,2(X)$  (11). Bean e Butler (1997, 1998) realizaram uma série de experimentos sofisticados para caracterizar de fato a dinâmica folicular em um grande número de vacas leiteiras em lactação no início do pós-parto e relacionaram a dinâmica do desenvolvimento folicular ao status hormonal e metabólico das vacas. O desenvolvimento folicular anterior à primeira ovulação foi caracterizado em 45 vacas pós-parto pela ovulação do primeiro folículo dominante (n=10), por uma ou mais

ondas de folículos dominantes anovulatórios (n=18) ou pela formação de um cisto folicular (n=8). A dinâmica folicular dessas três categorias e as concentrações associadas de estradiol plasmático encontram-se na Figura 1 (12). Houve um aumento no FSH plasmático entre os dias 1 e 5 do pós-parto após uma queda abrupta no estradiol plasmático a partir do primeiro dia do pós-parto. Todas as vacas produziram uma onda posterior de desenvolvimento folicular caracterizada pelo surgimento de um grande folículo dominante na segunda semana após o parto. Esta fase de desenvolvimento do folículo dominante ocorreu no período inicial de status energético negativo e tudo indica que o aumento inicial no FSH plasmático e o surgimento de folículos dominantes não foram influenciados pelo status energético negativo.

Do ponto de vista endócrino, o desenvolvimento folicular pode ser dividido nos seguintes estágios: independência de gonadotropina (folículos com dimensões < 3mm), dependência de FSH (folículos de 3 a 10 mm), dependência de LH pulsátil (10 mm até o tamanho pré-ovulatório) e dependência de um pico pré-ovulatório de LH para a ovulação. Aparentemente, os dois últimos estágios dependentes de LH interagem com os hormônios metabólicos e estão associados a padrões de desenvolvimento folicular. Por exemplo, a primeira onda na fase inicial do desenvolvimento folicular na vaca n°. 4690 (Figura 1) foi associada a um aumento substancial no estradiol, que resultou na ovulação do primeiro folículo dominante. Por outro lado, as vacas com ondas foliculares recorrentes no período anterior à primeira ovulação (por exemplo, a vaca n°. 4440, Figura 1) não demonstraram

Figura 1. Padrões de crescimento do folículo dominante e níveis de estradiol em três vacas



holandesas representativas que 1) ovularam o folículo dominante da primeira onda folicular PP, 2) apresentaram várias ondas de desenvolvimento de folículo dominante anovulatório e baixos níveis de estradiol plasmático ou 3) desenvolveram um cisto folicular com atividade estrogênica. \* Indica ovulação.

aumentos paralelos no estradiol. Aparentemente os folículos não eram competentes para secretar estradiol, embora o desenvolvimento folicular para a etapa pré-ovulatória tenha ocorrido antes do turnover ou atresia. Com base na nossa compreensão do desenvolvimento folicular essas vacas deveriam ter apresentado uma secreção suficiente de LH pulsátil para desenvolverem folículos de dimensões pré-ovulatórias. Em vacas com folículos dominantes precoces que produzem

estradiol e ovulam, as concentrações plasmáticas de IGF-1 são superiores em comparação às vacas que desenvolvem folículos anovulatórios no mesmo período. A maioria desses folículos estrogênicos e ovulatórios surgiu após o ponto mais baixo do balanço energético. Tudo indica que o IGF-1 regula o desenvolvimento folicular, uma vez que estimula a esteroidogênese e a proliferação de células foliculares (por exemplo, células da teca e da granulosa). Talvez as concentrações mais elevadas de IGF-1 das vacas na fase inicial do pós-parto aumentem a sensibilidade dos folículos dominantes em desenvolvimento ao FSH e LH. Vários laboratórios já determinaram a associação positiva entre as concentrações plasmáticas mais elevadas de IGF-1 e o status energético e a atividade no pós-parto mensurada pelo desenvolvimento anterior de folículos ovulatórios dominantes competentes e a ocorrência anterior de CL. Outro exemplo da associação entre as concentrações de IGF-I e o desenvolvimento folicular consiste na observação de que a redução aguda, induzida experimentalmente, no status energético (de +3,7 a -7,3 Mcal/dia) em um período de 4 dias de desenvolvimento terminal do folículo pré-ovulatório reduziu a taxa de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). A redução nas concentrações plasmáticas de IGF-I também foi associada à redução da função do folículo dominante.

O terceiro padrão de desenvolvimento folicular pós-parição, associado ao desenvolvimento de um cisto folicular ativo para estrogênio (Figura 1, vaca nº. 4512) indica uma disfunção adicional no controle do desenvolvimento do folículo ovariano. Neste caso, um folículo dominante funcionalmente ativo que produz estradiol se desenvolveu nas primeiras 2 semanas após o parto, porém a vaca mostrou-se incapaz de induzir um pico pré-ovulatório de LH para induzir a ovulação. Parece haver uma disfunção inerente ao eixo hipotalâmico-hipofisário, uma vez que a vaca não respondeu ao efeito de feedback positivo do estradiol para induzir um pico de LH semelhante ao pré-ovulatório. Talvez isso se deva a respostas metabólicas e ao stress associado à lactação e à partição de nutrientes que predispõem certos animais a essa condição. O destino do folículo dominante da primeira onda gerou um impacto significativo no intervalo anovulatório pós-parto. A regressão do folículo dominante da primeira onda e a formação de um cisto folicular prolongaram substancialmente o intervalo até a primeira ovulação (aproximadamente 50 dias) em comparação a 20 dias nas vacas que ovularam o folículo dominante da primeira onda.

#### *Associações entre Estradiol, PGFM, Progesterona e a Saúde e a Função Uterina no Pós-Parto*

Segundo Lewis et al. (1997), a maioria das vacas desenvolve endometrite não-patológica leve na fase inicial do puerpério do período pós-parto. Líquidos uterinos (lóquio) são geralmente eliminados nas primeiras 2 semanas após o parto. De fato, o sistema imune uterino parece ser supra-regulado durante o periparto e permanece assim até que o sistema imune uterino seja infra-regulado pela progesterona da primeira ovulação pós-parto. Após o aumento nos níveis de progesterona as vacas susceptíveis a infecções uterinas inespecíficas tendem a desenvolver infecções uterinas.

Infecções uterinas espontâneas ou induzidas elevam as concentrações de PGFM no plasma (Lewis et al., 1997). Um estudo recente examinou a relação entre as concentrações de PGFM de vacas holandesas e a incidência de endometrite pós-parto (Seal et al., 2002). O início da endometrite foi associado a um aumento nas concentrações de progesterona. As vacas que desenvolveram endometrite sofreram alterações dinâmicas nas concentrações de PGFM com

menores concentrações de PGFM na fase inicial do pós-parto (ou seja, 0 a 14 dias após o parto). Entretanto, a endometrite foi identificada em um período em que as vacas apresentavam concentrações mais elevadas de PGFM. Esses profissionais questionaram se alterações na produção de prostaglandina uterina poderiam afetar a capacidade do útero de prevenir e/ou de tratar infecções. Por exemplo, a queda nas concentrações de PGFM na fase inicial do pós-parto pode aumentar a incidência de endometrite. O tratamento de vacas diagnosticadas com endometrite com uma única injeção de PGF<sub>2α</sub> (25 mg; Lutalyse; Pharmacia Animal Health, Kalamazoo, MI) não afetou o intervalo entre o parto e a primeira detecção de estro (29,5 dias) ou a IA (73,3 dias). Uma estratégia para aumentar a disponibilidade de prostaglandinas como possível meio de promoção da função dos neutrófilos não deixa de ser uma possibilidade interessante no tratamento de infecções uterinas. Outros estudos devem ser realizados para avaliar métodos para promover a secreção uterina ou para administrar PGF<sub>2α</sub>, mantendo a exposição.

O uso de um implante de agonistas de GnRH (Deslorelina) pode suprimir o crescimento folicular, reduzir as concentrações de estradiol e retardar tanto o desenvolvimento do CL quanto as concentrações de progesterona em vacas leiteiras após a parição (Mattos et al., 2001). Partimos da hipótese de que a administração de um implante de Deslorelina imediatamente após a parição eliminaria ovulações, prevenindo uma infra-regulação de indução progestacional na função imune uterina. Realizamos um estudo para avaliar a atividade folicular ovariana, a presença de CL e involução uterina em vacas tratadas com um implante de Deslorelina não degradável (5 mg; n = 10) ou em um grupo controle (n = 9) que não recebeu implante (Silvestre et al., 2002). As vacas receberam os implantes de Deslorelina entre os dias 1 e 4 após o parto. Todas as vacas tiveram parição normal sem distocia, retenção das membranas fetais ou febre do leite. Utilizou-se ultra-som para monitorar uma série de folículos ovarianos (Classe 1,  $\leq 5$  mm; Classe 2, 6-9 mm; Classe 3  $\geq 10$  mm, além de vários CL) ipsilaterais e contralaterais ao corno da gestação anterior (CGA) nos dias 21, 28 e 35 após a inclusão no estudo. Medimos os diâmetros dos cornos uterinos por US a 4 cm após o ligamento intercornual e o colo. A endoscopia vaginal avaliou o corrimento e a coloração do colo nos dias 14, 21, 28 e 35 após a inclusão das vacas no estudo. A atividade ovariana foi suprimida no grupo que recebeu o implante de Deslorelina com base na falta de folículos Classe 2 ( $0,0 \pm 0,19 < 0,9 \pm 0,2$  P<0,01) e Classe 3 ( $0,0 \pm 0,19 < 1,3 \pm 0,20$ ; P<0,01), dependentes da secreção de gonadotrofina. O implante de Deslorelina reduziu o número de CL ( $0,0 \pm 0,09 < 0,45 \pm 0,1$ ; P <0,01). O implante de Deslorelina, inserido no período de 1-4 dias após o parto, diminuiu o tamanho do corno uterino na gestação anterior (Figura 2) e reduziu a frequência de corrimento purulento da abertura do colo. Os resultados do experimento colocam em dúvida os méritos da estimulação da atividade ovariana no início do pós-parto e a necessidade de suplementar estrógenos no período imediatamente após a parição. Entretanto, não se descarta o benefício potencial oferecido por tratamentos de estrógeno que podem temporariamente postergar as ovulações no pós-parto. A ausência de atividade ovariana no período de involução uterina parece importante ao processo involutivo. Talvez isso explique por que vacas de corte com bezerro ao pé sofrem menos problemas que acometem o útero no pós-parto. Tratamentos que retardam a atividade ovariana ou que reduzem a exposição sustentada de progesterona requerem mais estudos para investigar a promoção da fertilidade e da saúde uterina, tanto em vacas leiteiras em lactação clinicamente normais quanto anormais.

Os mecanismos associados à involução mais rápida do trato reprodutivo no grupo de vacas tratadas com o implante Deslorelina provavelmente envolvem vários fatores. A redução no diâmetro do CGA nas primeiras medições com ultra-som (ou seja, 16, 23 e 30 DPP) pode estar associada aos efeitos diretos do agonista de GnRH no útero, à redução nas concentrações basais de estradiol e à queda na secreção de gonadotrofinas pituitárias.

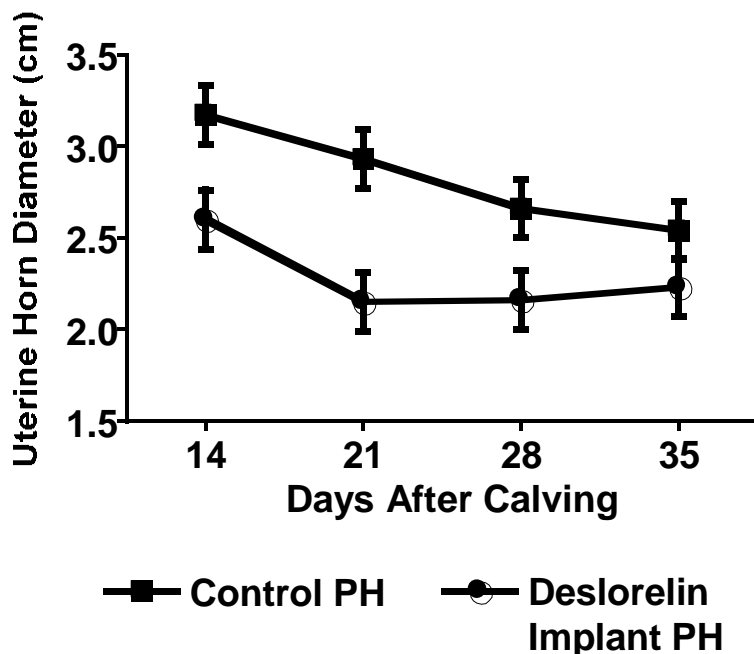


Figura 2. Tamanho do corno uterino da gestação anterior (CGA) em vacas leiteiras em lactação tratadas com ou sem implante de Deslorelina no período de 1 a 4 dias após o parto.

A expressão do mRNA do receptor de GnRH foi identificada nas células do miométrio de ratos e no endométrio de seres humanos. Entretanto, as ações do GnRH nesses tecidos ainda não foram totalmente esclarecidas. O tratamento crônico com agonistas de GnRH é amplamente utilizado em mulheres com leiomiomas sintomáticos, endometriose e carcinoma endometrial. Tais condições são consideradas estrógeno-dependentes e, portanto, o agonista de GnRH é um método farmacológico eficiente e reversível para se atingir o hipoestrogenismo que, por sua vez, reduz o volume do tumor. Além disso, a histerectomia é precedida por um tratamento com agonistas de GnRH para reduzir o volume uterino e facilitar procedimentos cirúrgicos abdominais ou vaginais.

A redução do tamanho do útero após o tratamento crônico com agonistas de GnRH em indivíduos do sexo feminino resulta da atrofia induzida das artérias arqueadas e do miócito e da redução do edema estromal (Weeks et al., 1999). A atrofia espontânea do miométrio também ocorre em vacas no pós-parto e inicia-se 3 dias após a parição (Archbald et al., 1972). Além disso, o volume e a espessura do endométrio diminuíram em mulheres tratadas com agonistas de GnRH. Esses processos costumam ocorrer em ambientes com baixos níveis de estrógeno, como no grupo tratado com o implante Deslorelina durante o período de involução uterina. A ligação



do FSH e LH aos respectivos receptores também está associada a uma ativação direta da adenilato ciclase para produzir cAMP e à ativação de vias de sinalização que elevam a expressão da COX-2 e a produção de PGE<sub>2</sub> no miométrio e no colo (Shemesh et al., 2001). Tanto cAMP quanto PGE<sub>2</sub> induzem o relaxamento desses tecidos.

Embora as concentrações plasmáticas de FSH e LH não tenham sido mensuradas neste estudo é bem provável que o tratamento crônico com agonistas de GnRH tenha inibido a secreção de FSH e LH no grupo que recebeu o implante Deslorelina com base na supressão do desenvolvimento folicular (Mattos et al., 2001), que reduziria o relaxamento uterino. Por outro lado, as vacas Controle começaram a secretar FSH e LH na fase inicial do pós-parto após a redução dos níveis de progesterona e de estrógenos e a eliminação da placenta.

Thatcher e Wilcox (1972) sugeriram uma associação entre a atividade de estro precoce e freqüente e o aumento do desempenho reprodutivo graças à melhor restauração do ambiente uterino. Neste estudo, vacas expressando 0 ou 1 estro no período de 60 dias após a parição apresentavam queda na fertilidade, aumentando a porcentagem de vacas não-prenhes comercializadas e a necessidade de mais serviços por gestação. Tais respostas diminuíam linearmente à medida que o número de estros aumentava, ou seja, as vacas que manifestaram 2, 3 ou 4 estros eram mais férteis. A conclusão de que ciclos estrais espontâneos durante o pós-parto podem promover a involução uterina e a fertilidade subsequente ainda é discutível. Animais sem período estral poderiam representar uma parcela maior de vacas com distúrbios do periparto, como distocia, retenção da placenta, distúrbios metabólicos e metrite. As vacas expressando 0 ou 1 estro poderiam representar animais com fase luteal prolongada (incapacidade de regressão do CL) e com possível contaminação bacteriana no útero, comprometendo a fertilidade dessas vacas. Os animais que manifestam dois ou mais estros são representativos de vacas com pós-parto normal. Essas vacas conseguem ovular uma vez e continuam ovulando. Portanto, há uma cascata de eventos do momento da parição até o primeiro serviço. Eventos no início do pós-parto (distocia, retenção das membranas fetais, doenças metabólicas, metrite) estão relacionados à saúde e à involução uterina, que determinarão o momento da primeira ovulação e a fertilidade posterior. Assim, propomos o estabelecimento de uma via do útero ao ovário, ou seja, a conclusão da involução física e o esvaziamento do útero devem ocorrer rapidamente no início do pós-parto, sem a ocorrência de ovulações. Após o término da involução uterina as ovulações sequenciais seriam consideradas uma meta em prol da fertilidade normal.

## **Manejo Periparto e Pós-Parto**

### *Metrite e Endometrite*

A metrite séptica é uma condição grave que acomete as vacas leiteiras, uma vez que afeta a produção, a fertilidade e pode até ser fatal. Uma boa compreensão dos fatores relacionados à parição que predispõem as vacas à metrite séptica ajudaria a prevenir, diagnosticar e tratar essa condição. Um estudo prospectivo longitudinal foi realizado em uma granja de 100 vacas leiteiras no norte da Flórida entre 1º de agosto de 2002 e 15 de abril de 2003 para avaliar o efeito do status de parição, da parição e da estação na incidência de metrite séptica do pós-parto em vacas leiteiras em lactação e o papel da temperatura retal na previsão dessa condição (Benzaquen et al.,

2004). A granja utilizou um programa de monitoramento sanitário e o status de parição foi determinado com base na ocorrência ou ausência de distocia, retenção das membranas fetais (RMF) e partos gemelares. As vacas com status de parição normal não apresentaram problemas relacionados ao parto. As vacas com status de parição anormal apresentaram distocia, RMF acompanhada ou não de distocia ou partos gemelares. A temperatura retal de todas as vacas foi registrada diariamente entre as 7:00 e 9:00 dos dias 3 a 13 do pós-parto e o exame sanitário foi realizado pelo veterinário da granja. As vacas que pareciam doentes (deprimidas, com olhos entreabertos) ou cuja temperatura era  $>39,5^{\circ}\text{C}$  foram examinadas para se verificar a incidência de metrite séptica. O critério para o diagnóstico de metrite séptica foi a presença de um corrimento aquoso, de coloração marrom e fétido da vulva (observado após palpação retal do útero), acompanhado ou não de temperatura retal  $>39,5^{\circ}\text{C}$ . As vacas diagnosticadas com metrite séptica foram tratadas com antibióticos sistêmicos, agentes antiinflamatórios, suplementos de cálcio e energéticos. O índice de calor térmico (ICT) foi calculado através da temperatura ambiente e da porcentagem de umidade relativa registrada na estação meteorológica mais próxima. Duas estações foram definidas com base no ICT: uma estação fria, com  $\text{ICT} < 76,2$  de outubro a abril, e uma estação quente, com  $\text{ICT} \geq 76,2$  de maio a setembro.

Os dados para incidência de metrite séptica por status de parição, parto e estação foram

Tabela 1: Risco de Desenvolvimento de Metrite

Variável	Fator de Risco	95% IC (Wald)	P
Status de parição			
Normal	1,0 (13%)	Referência	NA
Anormal	4,8 (41%)	2,9 – 8,0	$< 0,01$
Parição *Estação			$< 0,01$
Primípara			
Fria	1,0 (39%)	Referência	NA
Quente	0,6 (8%)	0,44 – 0,93	$< 0,05$
Múltipara			
Fria	1,0 (11%)	Referência	NA
Quente	1,2 (18%)	0,82 – 1,71	$> 0,05$

analisados por análise de sobrevivência (teste Proc Life e regressão de Cox). Interações duplas e tridirecionais entre os principais efeitos (status de parição, estação, parto) para se verificar a incidência de metrite séptica foram testadas pelo Modelo Linear Geral. As temperaturas retais foram analisadas com o Proc Mixed do SAS.

Das 450 partições avaliadas no estudo, 327 (73%) foram normais e 123 (27%) anormais. As vacas com status de parição normal apresentaram menor incidência de metrite séptica em comparação às vacas com status de parição anormal (43/327 [13%] x 51/123 [41%], respectivamente;  $P < 0,01$ ). A incidência de metrite séptica foi maior nas vacas primíparas ( $P < 0,01$ ), independentemente do status de parição durante a estação fria. Por outro lado, não houve diferença na incidência de metrite séptica nas vacas múltiparas, seja na estação fria ou quente (Tabela 1).

Tanto nas vacas primíparas quanto múltíparas as temperaturas retais nos dias 3 a 13 do pós-parto e nos 5 dias que antecederam o diagnóstico de metrite séptica foram mais elevadas nas vacas que desenvolveram metrite séptica, independentemente do status de parição. Nas vacas que apresentaram metrite séptica, as diferenças na média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da temperatura retal diária em comparação às vacas que não desenvolveram metrite séptica começaram a aumentar 48 horas antes do diagnóstico (Dia 0) de metrite séptica: Dia -2:  $0,20 \pm 0,18$ ,  $P < 0,2$ ; Dia -1:  $0,68 \pm 0,18$ ,  $P < 0,01$ ; Dia 0:  $1,44 \pm 0,18$ ,  $P < 0,01$ ). Parto, status de parição e estação foram os fatores de risco para o desenvolvimento de metrite séptica em vacas leiteiras no pós-parto. Aumentos na temperatura retal em dois dias consecutivos poderiam ser utilizados para prever o desenvolvimento de metrite séptica.

A endometrite é definida como uma inflamação do endométrio sem sinais sistêmicos. A endometrite pós-parto gera efeitos negativos no desempenho reprodutivo, conforme demonstrado claramente pelas observações recentes de Kasimanickam et al., 2004. Vacas holandesas de duas granjas leiteiras foram examinadas no período de 20-33 dias em lactação. O estudo envolveu vacas clinicamente normais ( $n=228$ ) com base na ausência de corrimento anormal após inspeção externa e vaginoscopia. O trato reprodutivo das vacas foi avaliado por palpação transretal, ultrassom e citologia do endométrio. As mesmas vacas foram re-examinadas em uma segunda visita entre os dias 34-47 (ou seja, 2 semanas mais tarde) e acompanhadas por 8 meses adicionais (até ficarem prenhes ou serem descartadas). O desempenho reprodutivo das vacas encontra-se resumido na Tabela 2.

Tabela 2. Desempenho reprodutivo de vacas com endometrite subclínica e vacas normais na visita 1 (20-33 DPP) e na visita 2 (34-47 DPP).

End point	Visita 1		Visita 2	
	Endometrite subclínica	Normal	Endometrite subclínica	Normal
No.	97	118	89	126
TCPS (%) <sup>1</sup>	18 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>
TCTS (%) <sup>2</sup>	43 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>	35 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>
MDV <sup>3</sup> (95% IC <sup>5</sup> )	141 <sup>a</sup> (114-177)	112 <sup>b</sup> (99-128)	162 <sup>a</sup> (141-190)	100 <sup>b</sup> (93-106)
MDPS <sup>4</sup> (95% IC <sup>5</sup> )	88 <sup>a</sup> (81- 92)	87 <sup>a</sup> (81-91)	89 <sup>a</sup> (82-92)	84 <sup>a</sup> (79-91)

Os números referentes à mesma visita e à mesma linha sem sobrescrito comum (a e b) apresentam diferenças ( $P < 0,05$ )

<sup>1</sup>Taxa de concepção no primeiro serviço; procedimento GENMOD.

<sup>2</sup>Taxa de concepção em todos os serviços; procedimento GENMOD.

<sup>3</sup>Média de dias vazios; procedimento LIFETEST.

<sup>4</sup>Média de dias até o primeiro serviço; procedimento LIFETEST.

<sup>5</sup>Intervalo de confiança.

Fica claro que as vacas diagnosticadas com endometrite subclínica (ou seja, > 10 % de leucócitos no esfregaço do endométrio ou líquido no útero identificado por ultra-som na segunda visita) apresentaram menor taxa de concepção ao primeiro serviço, menor taxa de concepção a todos os serviços, maior média de dias até o primeiro serviço e maior média de dias vazios. A partir deste estudo pode-se concluir que a endometrite subclínica detectada por citologia do endométrio ou diagnóstico por ultra-som do líquido no útero está associada à redução na fertilidade. Assim, o ambiente intrauterino é fundamental e indicativo da fertilidade subsequente e consiste em uma condição não detectada por exame de rotina através de palpação transretal. A redução na incidência de metrite e de endometrite subclínica é vital para que as vacas estejam mais férteis ao entrarem no período reprodutivo e possam responder ao sistema programado de manejo reprodutivo.

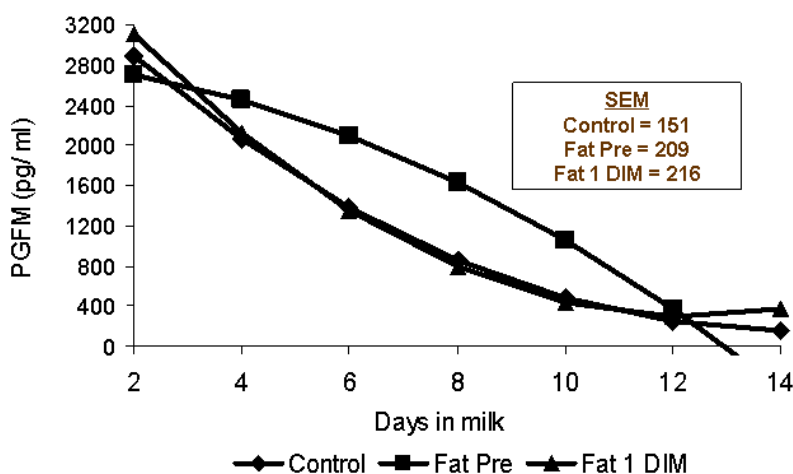
#### *Fornecimento de Sais de Cálcio de Ácido Linoléico no Periparto*

Um número cada vez maior de evidências revela que a forma e a administração de suplementos de ácidos graxos insaturados à porção distal do intestino para absorção (principalmente ácido linoléico, ácido linolênico, EPA e DHA) podem ter como alvo tecidos reprodutivos para alterar a função reprodutiva e a fertilidade. A promoção do desempenho reprodutivo envolve a estimulação da atividade ovariana (desenvolvimento do folículo) no pós-parto e, possivelmente, melhores taxas de prenhez devido ao aumento da produção e/ou redução do clearance de progesterona. Alterações na dinâmica folicular podem ser afetadas pela suplementação de gordura, envolvendo alterações potenciais na sensibilidade ovariana a hormônios metabólicos, como bST, fator de crescimento semelhante à insulina-I e gonadotrofinas (LH e FSH). Além disso, a inibição da secreção de prostaglandina uterina por ácidos graxos ômega 3 pode aumentar as taxas de prenhez.

Examinamos recentemente se o fornecimento de sais de cálcio contendo basicamente ácido linoléico produziria efeitos moduladores na dinâmica pós-parto da secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , na saúde das vacas, na produção de leite e no desempenho reprodutivo (Cullens et al., 2004). Vacas holandesas primíparas (n=22) e multíparas (n=25) foram incluídas em um estudo com delineamento totalmente randomizado para determinação dos efeitos do início da suplementação de gordura (Megalac-R, Church & Dwight Co. Inc., Princeton, N. J.) no desempenho da vaca nas primeiras 14 semanas após o parto (PP). Megalac-R contém ~28% de ácido linoléico (n-6, C18:2) e ~4% de ácido linolênico (n-3, C18:3). Os quatro tratamentos nutricionais consistiram de: 1) Grupo controle (sem suplementação de fonte de gordura; Tratamento 1) e Tratamentos 2-4 com suplementação de Megalac-R (2% de matéria seca na dieta) começando 28 dias antes da data de parição esperada (ou seja, Tratamento 2), no dia da parição (Tratamento 3), ou aos 28 dias em lactação (Tratamento 4). As vacas que receberam Megalac receberam 227 g por dia no período pré-parto e 454 g por dia no pós-parto. O estudo foi delineado para ser realizado no período de estresse térmico do verão na Flórida. Amostras sanguíneas foram coletadas 3x por semana, da parição até 10 semanas após a parição. Iniciou-se um programa Ovsynch no período de 5 a 10 d do ciclo no dia 62 PP com IA ocorrendo no dia 72 PP. Os contrastes ortogonais testados para os tratamentos foram 1 vs. (2+3+4), 2 vs. (3+4) e 3 vs. 4. A produção média de leite foi de 38,1, 41,5, 36,5 e 37,1 kg/d e, de um modo geral, foi maior ( $P = 0,06$ ) nas vacas que começaram a receber gordura no pré-parto em comparação ao período PP (Tratamento 2 x Tratamentos 3 e 4). O padrão das concentrações plasmáticas de progesterona acumuladas da

parição até 79 DPP não diferiu entre os tratamentos. Das vacas que ovularam com o protocolo Ovsynch, aquelas que receberam gordura (Tratamento 1 x Tratamentos 2,3 e 4;  $P = 0,09$ ) geraram melhores taxas de concepção no primeiro serviço do que as vacas do grupo controle (27,8 [3/11], 40,0 [4/10], 70 [7/10] e 63,6% [7/11]).

Os perfis de PGFM (Figura 3) nos primeiros 12 dias do pós-parto diferiram entre os grupos que receberam Meglac-R no início do pré-parto (Tratamento 2) e as vacas que começaram a receber Meglac R no início do parto (Tratamento 3) ou que não receberam Meglac R nos primeiros 12 dias após o parto (Tratamentos 1 e 4). Nossa interpretação é a de que as vacas que receberam Meglac R no pré-parto apresentaram *pools* lipídicos ricos em ácido linoléico e que o maior pool de ácido linoléico aumentou as concentrações de substrato de ácido araquidônico, o precursor da síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Conforme descrito anteriormente, há uma estimulação marcante da secreção uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  associada ao processo de parição, principalmente do tecido caruncular. O maior potencial de secreção de prostaglandinas do útero e das células do sistema imune devido à administração *by-pass* de ácido linoléico-sais de cálcio pode promover a saúde uterina e a imunocompetência da vaca no pós-parto. De certa forma, tal fato pode ser confirmado pelo exame da frequência de distúrbios na saúde das vacas que receberam Meglac-R no pré-parto em comparação aos controles e às vacas tratadas com Meglac-R no pós-parto. Os resultados deste estudo indicam que o fornecimento de gordura no início do período seco e ao longo do pós-parto parece beneficiar a saúde após a parição, a produção de leite e o desempenho reprodutivo. A abordagem nutracêutica para promover a saúde, a produção de leite e o desempenho reprodutivo requer a realização de mais estudos envolvendo um grande número de vacas.



Fat pre vs. no fat pre, quadratic curves differ;  $P < 0.01$

Figura 3. Efeito da suplementação de Megalac-R nos níveis plasmáticos de 13-14 diidro, 15 ceto-PGF<sub>2α</sub> (PGFM; ng/ml) de vacas leiteiras em lactação.

Tabela 3. Efeito da suplementação de Megalac-R na incidência de distúrbios na saúde de vacas leiteiras em lactação.

Tratamento Nutricional	Vacas Saudáveis	Doença ou distúrbio <sup>1</sup>
Gordura – Pré-Parto (Tratamento 2)	11	1
Controle e fornecimento de gordura no pós-parto (Tratamentos 1, 3 e 4)	20	15 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mastite, retenção das membranas fetais, temperatura elevada ou infecção respiratória

<sup>2</sup> Vacas que receberam gordura no pré-parto apresentaram probabilidade 5,6 menor de distúrbios de saúde em comparação às que não receberam gordura na fase pré-parto, P=0,05 (procedimento logístico).

### *Claudicação*

Segundo as observações clínicas de veterinários e produtores da Flórida, a claudicação exerce um efeito prejudicial na atividade ovariana de vacas leiteiras em lactação. Os veterinários e os produtores de leite preferem evitar o uso de protocolos de sincronização e de inseminação programada em vacas que claudicam, pois já se sabe que vacas com claudicação sofrem maiores perdas de condição corporal, passam menos tempo se alimentando e tendem a ciclar menos que as demais vacas enquanto a claudicação persiste. Partimos do seguinte princípio: à medida que as vacas com claudicação sofrem uma perda mais acentuada da condição corporal (e, portanto, um estado prolongado de balanço energético negativo) na fase inicial do pós-parto, aumentam o risco de atraso da ciclicidade ovariana em comparação às vacas que não estão claudicando. Pode-se determinar a função do corpo lúteo nas condições de campo através do monitoramento semanal das concentrações plasmáticas de  $P_4$  durante a lactação, antes e após o diagnóstico de claudicação em vacas leiteiras. O estudo apresentado aqui (Gabarino et al., 2004) teve como objetivo examinar a relação entre a claudicação e o atraso da retomada da ciclicidade ovariana.

Um estudo longitudinal observou a relação entre claudicação e o atraso da retomada da ciclicidade ovariana nos primeiros 60 dias pós-parto e no intervalo de dias até a primeira atividade luteal nos primeiros 300 dias após a parição em vacas Holandesas. O estudo analisou duzentas e trinta e oito vacas de uma granja leiteira de 600 vacas que pariram em um período de doze meses. As vacas foram classificadas em uma das seis categorias de claudicação nos primeiros 35 dias após o parto através de um sistema de pontuação da locomoção (Gabarino et al., 2004). Na análise, as vacas que não estavam claudicando apresentaram pontuações = 3 para apenas uma semana ou pontuações  $\leq 2$ . Marcha normal foi o raciocínio utilizado para classificar as vacas com pontuação = 2 como sem claudicação. As vacas classificadas com claudicação moderada foram as que obtiveram 3 pontos em duas semanas consecutivas para reduzir o risco de erros na classificação. As vacas com claudicação foram as que receberam 4 ou 5 pelo menos uma vez na escala de pontuação. Amostras sanguíneas semanais foram coletadas para detecção das concentrações plasmáticas de  $P_4$  nos primeiros 300 dias após o parto. As vacas com atraso da retomada da ciclicidade ovariana apresentaram concentrações consistentemente baixas de  $P_4$  ( $< 1\text{ng/ml}$ ) nos primeiros 60 dias após o parto. A hipótese nula de risco de ciclicidade tardia equivalente nas vacas sem claudicação, com claudicação moderada ou com claudicação (após ajuste para possíveis efeitos modificadores ou contraditórios de perda de condição corporal e outras variáveis relacionadas à ciclagem tardia) foi testada através de regressão logística.

A análise dos resultados deste estudo corrobora a hipótese de que a claudicação prejudica a atividade ovariana das vacas Holandesas na fase inicial do pós-parto (Tabela 4). As vacas com claudicação apresentaram probabilidade 3,50 maior de atraso da retomada da ciclicidade em comparação às vacas sem claudicação (Fator de Risco = 3,50; 95% IC= 1,00 – 12,21;  $P = 0,04$ ). A cetose, por si só, foi considerada fator de risco para a retomada da ciclicidade ovariana (FR= 2,76; 95% IC = 1,08–7,06;  $P = 0,03$ ). Também é possível que a claudicação e a cetose possam interagir entre si, afetando o risco de ciclicidade tardia, porém a amostra deste estudo foi pequena demais para detectar adequadamente tal interação. A claudicação pode reduzir a ingestão de matéria seca, gerando balanço energético negativo. Acredita-se que o balanço energético negativo aumente a formação de corpos cetônicos e atrase o início da atividade ovariana. Além de contribuir para o aumento da cetogênese, o balanço energético negativo no

pós-parto também acaba atrasando o início da atividade ovariana, principalmente se a deficiência de energia for prolongada (Butler e Smith, 1989; Staples et al., 1990; Lucy et al., 1992). Além disso, os resultados deste estudo revelam que o risco de ciclicidade tardia foi inferior nas vacas com alta produção de leite em comparação às de produção média ou baixa. Resultados de estudos anteriores associam vacas com baixa produção de leite à menor ingestão de matéria seca, a um balanço energético ainda mais negativo e à menor probabilidade de restauração da atividade ovariana nos primeiros 63 dias após o parto em comparação a vacas com alta produção de leite (Staples et al., 1990; Lucy et al., 1992).

Tabela 4 – Modelo de regressão logística final para avaliação do risco de ciclagem tardia em vacas Holandesas no pós-parto

Variável	Fator de risco ajustado	Intervalo de Confiança (95%)	Valor <i>P</i>
Grupo com claudicação			
Escore de locomoção ≤ 2	1,00	Referência	NA
3	2,14	0,74 – 6,14	0,15
4	3,50	1,00 – 12,21	0,04
Número de lactações			
1	1,00	Referência	NA
≥ 2	1,23	0,50 – 2,33	0,65
Estação			
Inverno	1,00	Referência	NA
Verão	0,95	0,38 – 2,33	0,90
Cetose			
Não	1,00	Referência	NA
Sim	2,76	1,08 – 7,06	0,03
Produção leiteira			
Baixa	0,99	0,39 – 2,52	0,98
Média	1,00	Referência	NA
Alta	0,21	0,05 – 0,98	0,04

### Resumo

Embora o manejo reprodutivo programado já tenha avançado muito nos últimos tempos, o desempenho reprodutivo ainda não pode ser considerado ideal. Fica claro que o manejo da vaca leiteira em lactação requer atenção especial no periparto e no pós-parto para otimizar a transição do período seco para o período de lactação e promover a saúde geral, a função imune e a restauração da competência reprodutiva. O desenvolvimento de programas para otimizar a saúde, a produção leiteira e o desempenho reprodutivo compreende a integração da nutrição, da saúde do rebanho e de programas de manejo reprodutivo.



### Referências

- Archbald LF, Schultz RH, Fahning ML, Kurtz HJ, Zemjanis R., A sequential histological study of the post-partum bovine uterus. *J. Reprod. Fertil.* 1972; 29: 133-136.
- Beam SW, Butler WR. Energy balance, and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 1997; 56:133-142.
- Beam SW, Butler WR. Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 121-131.
- Benzaquen ME, Risco C, Archbald LF, Thatcher MJ, Thatcher WW. Evaluation of rectal temperature and calving related factors on the incidence of metritis in postpartum dairy cows. *The AABP Proceedings* 2004; 37: 197-198.
- Butler WR, Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1989; 72:767-783.
- Canfield RW, Butler WR. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Dom Animal Endoc* 1990; 7:323-330.
- Cullens FM, Staples CR, Bilby TR, Silvestre F, Bartolome J, Sozzi A, Badinga L, Thatcher WW, Arthington JD. Effect of timing of initiation of fat supplementation on milk production, plasma hormones and metabolites, and conception rates of Holstein cows in summer. *J. Dairy Sci* 2004; 87 (Suppl. 1):308.
- Garbarino EJ, Hernandez JA, Shearer JK, Risco CA, Thatcher WW. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *J Dairy Sci* 2004; 87: 4123-4131.
- Guilbault LA, Thatcher WW, Drost M, Hopkins SM. Source of F series prostaglandins during the early postpartum period in cattle. *Biol Reprod* 1984a; 31:879-887.
- Guilbault LA, Thatcher WW, Foster DB, Caton D. Relationship of 15-keto-13,14-dihydro-PGF2 concentrations in peripheral plasma with local uterine production of F series prostaglandins and changes in uterine blood flow during the early postpartum period of cattle. *Biol Reprod* 1984b; 31:870-878.
- Kasimanickan R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 2004; 62:9-23.
- Lewis GS. Symposium: Health problems of the post-partum cow. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 1997; 80: 984-994.

Lucy MC, Beck J, Staples CR, Head HH, De La Sota RL, Thatcher WW. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-1) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reprod Nut Dev* 1992; 32:331-341.

Mattos R, Orlandi C, Williams J, Staples CR, Trigg T, Thatcher WW. Effect of an implant containing the GnRH agonist Deslorelin on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2001; 56:371-386.

Seals RC, Matamoros I, Lewis GS. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2α</sub> concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J Anim Sci* 2002; 80:1068-1073.

Shemesh M, Action of gonadotrophins on the uterus. *J Reprod Fertil* 2001; 121, 835-842.

Silvestre FT, Bartolome JA, Kamimura S, Arteche ACM, Pancarci SM, Trigg T, Thatcher WW. Postpartum suppression of ovarian activity with a Deslorelin implant enhanced uterine involution in lactating dairy cows. *Anim Sci* 2002; 80 Suppl. 1/ *J. Dairy Sci.* 85 Suppl.1: 262 (Abstract).

Smith MC, Wallace JM, Influence of early postpartum ovulation on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. *Reprod Fertil Develop* 1998;10, 207-216. Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 1990; 73:938-947.

Thatcher WW, De La Sota RL, Schmitt E J-P, Diaz T, Badinga L, Simmen FA, Staples CR, Drost M. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fertil Dev* 1996; 8:203-217.

Thatcher WW, Wilcox CJ. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Dairy Sci* 1973; 56:608-610.

Thatcher WW, Wilcox CJ, Collier RJ, Eley DS, Head HH. Bovine conceptus-maternal interactions during the pre- and postpartum periods. *J Dairy Sci* 1980; 63: 1530-1540.

Weeks AD, Wilkinson N, Arora DS, Duffy SR, Wells M, Walker JJ. Menopausal changes in the myometrium: an investigation using a GnRH agonist model. *Int J Gynecol Pathol.* 1999;18, 226-232.