



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Artigo de revisão

GESTÃO DO REPEAT BREEDING NAS VACAS LEITEIRAS

Callyane Coubard

Coimbra, junho 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Artigo de revisão

GESTÃO DO REPEAT BREEDING NAS VACAS LEITEIRAS

Coimbra, junho 2024

Callyane Coubard

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia
Alexandra Giestas Cancela Duarte

Arguente: Professora Doutora Sónia Custódia
Teixeira Macedo

Trabalho realizado sob a orientação das

Professoras

Professora Doutora Rosa Lino Neto

Professora Doutora Diana Valente

Dissertação de Mestrado do ciclo de estudos conducente ao grau Mestre
em Medicina Veterinária da EUVG

AGRADECIMENTOS

À Professora Rosa Lino Neto e à Professora Diana Valente, da Escola Universitária Vasco da Gama, que me deram a honra de aceitar supervisionar e corrigir este trabalho, pela vossa ajuda e pela vossa gentileza, os meus sinceros agradecimentos.

A todos os veterinários que me orientaram, na teoria e na prática, agradeço por transmitirem os seus conhecimentos com boa energia.

Aos meus amigos, com quem partilhei estes anos de estudo, sejam eles de França ou de Portugal, obrigada pelos bons momentos e por todo o apoio que me deram.

À minha família, que sempre me apoiou e me incentivou a seguir os meus sonhos.

Aos meus animaizinhos: Baikal, Indira, Ultimate, Perceval, Mistigri, Niagara e Sirius. Por me lembrarem porque amo tanto este trabalho, com um simples olhar deles.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	4
2. DEFINIÇÃO DE <i>REPEAT BREEDING</i>.....	5
3. CAUSAS DE <i>REPEAT BREEDING</i>	5
3.1. PROCEDIMENTOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INCORRETOS	7
3.2. PATOLOGIAS UTERINAS: FATORES DE RISCO E CONSEQUÊNCIAS NA FERTILIDADE	10
3.3. ANOMALIAS E LESÕES CONGÊNITAS OU ADQUIRIDAS DO APARELHO REPRODUTOR	12
3.4. ALIMENTAÇÃO	14
3.5. MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE	18
3.6. PERFIL HORMONAL ASSOCIADO À SÍNDROME DE RB	20
3.7. FATORES DE STRESS QUE INFLUENCIAM A SÍNDROME DE RB	22
4. NOVAS ESTRATÉGIAS APLICADAS NO CONTROLO E PREVENÇÃO DE <i>REPEAT BREEDING</i>	23
4.1. INTERVENÇÕES GENÉTICAS	23
4.2. TRATAMENTO DO RB COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS E LISADO DE PLAQUETAS PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	24
4.3. TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E “OVUM PICK UP”	25
5. CONCLUSÃO	28
BIBLIOGRAFIA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Causas do <i>repeat breeding</i>	7
Figura 2 - Método da transferência de embriões em bovinos	26
Figura 3 - Exemplo de protocolo de superovulação	27
Figura 4 - Abordagem diagnóstica ao <i>repeat breeding</i>	29

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACTH - Hormona Adrenocorticotropina

AG - Ácidos Gordos

AGNE - Ácidos Gordos Não Esterificados

BEN - Balanço Energético Negativo

CC - Condição Corporal

CL - Corpo Lúteo

DHA - Ácido Docosaheptaenóico

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermic Growth Factor*)

EPA - Ácido Eicosapentaenóico

FIV - Fertilização *in vitro*

FO - Fish Oil

FSH - Hormona Folículo Estimulante

GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (*Gonadotropin Releasing Hormone*)

IA - Inseminação Artificial

IFN- τ - Interferão τ

IGF-I - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo I

LH - Hormona Luteinizante

OPU - Ovum Pick-Up

P4 - Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina F2 α

PL - Lisado de Plaquetas

PRP - Plasma Rico em Plaquetas (*Platelet-Rich Plasma*)

PUFA n-3 - Ácidos Gordos Poliinsaturados n-3

RB - *Repeat Breeding*

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

TE - Transferência Embrionária

Gestão do repeat breeding nas vacas leiteiras

Callyane Coubard^a, Diana Valente^a, Rosa Lino Neto Pereira^{a,b}

^a Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-

210, Coimbra, Portugal (callyane@orange.fr) (diana.valente@euvvg.pt)

^b Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária , Unidade de Biotecnologia e recursos Genéticos, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarem, Portugal (rosa.linoneto@iniav.pt)

Resumo

A síndrome de *repeat breeding* (RB) em vacas leiteiras, caracterizada por ciclos éstricos normais sem concepção após múltiplas tentativas, representa um desafio significativo para a eficiência reprodutiva nas explorações pecuárias. O intervalo prolongado entre o parto e a concepção destas vacas, contribui para custos acrescidos com um impacto financeiro considerável, estimado em cerca de 5 € por dia em aberto, destacando a importância da resolução desta síndrome. A investigação minuciosa é crucial para identificar as causas subjacentes, que incluem problemas de saúde, nutrição inadequada, distúrbios hormonais, infeções uterinas e questões de manejo. A resolução destes problemas é fundamental para otimizar a eficiência reprodutiva e a produtividade em bovinos leiteiros. Além da gestão das causas mencionadas, diversas abordagens visam reduzir a ocorrência do *repeat breeding* ou valorizar as vacas afetadas. A intervenção genética é uma área de investigação importante na produção de bovinos de leite, com o objetivo de reduzir o RB por seleção genética. Terapias inovadoras, como o plasma rico em plaquetas e o lisado de plaquetas, atuam como fatores imunomoduladores da inflamação e tiveram resultados promissores na estimulação da produção de embriões *in vitro* e *in vivo* após diferentes tratamentos em vacas RB. Além disso, o uso da transferência de embriões obtidos de vacas RB de elevado valor genético constitui uma estratégia para valorizar esses indivíduos. A eficiência e rentabilidade nas explorações leiteiras dependem da identificação e resolução sistemática dos animais não produtivos. A abordagem sistemática na resolução das causas da síndrome de *repeat breeding* é essencial para melhorar o desempenho reprodutivo, garantindo a sustentabilidade e o sucesso económico das explorações.

Palavras-chave: falha na fertilização, inseminação artificial, morte embrionária, nutrição, Plasma Rico em Plaquetas, transferência de embriões, bovinos

Abstract

The *repeat breeding* syndrome (RB) in dairy cows, is characterized by normal estrous cycles without conception after multiple attempts, and represents a significant challenge for the reproductive efficiency in livestock farming. The prolonged interval between calving and conception observed in these cows contributes to increased costs with considerable financial impact, estimated at around €5 per open day, highlighting the importance of resolving this syndrome. A deep research is crucial to identify the RB underlying causes, which include health problems, inadequate nutrition, hormonal disorders, uterine infections, and management issues. Resolving these problems is essential to optimize reproductive efficiency and productivity in dairy cattle. In addition, to manage the above-mentioned causes, various approaches aiming to reduce the occurrence of *repeat breeding* and to valorize affected cows may be implemented. Genetic intervention is an important area of research in dairy cattle production, aiming to reduce RB through genetic selection. Innovative therapies, such as, platelet-rich plasma and platelet lysate, acting as immunomodulators of inflammation have shown promising results in stimulating embryo production both *in vitro* and *in vivo* after different treatments of RB cows. Furthermore, the use of embryo transfer obtained from high genetic value RB cows constitutes a strategy to valorize these individuals. The efficiency and profitability in dairy farming depend on the systematic identification and resolution of non-productive animals. A systematic approach to resolving the causes of *repeat breeding* syndrome is essential to improve reproductive performance, ensuring the sustainability and economic success of farms.

Key words: fertilization failure, artificial insemination, embryonic death, nutrition, Platelet Rich Plasma, embryo transfer, bovine.

1. INTRODUÇÃO

Repeat breeding, em tradução literal, significa "repetição de reprodução" e descreve uma patologia na qual uma vaca não consegue conceber apesar de apresentar múltiplos ciclos éstricos normais e ter sido submetida a várias tentativas de concepção. Durante muitos anos, os investigadores e técnicos estudaram a síndrome de *repeat breeding* (RB), em vacas que apresentavam sinais de estro em intervalos aparentemente normais (ou seja, ciclos éstricos entre 17 e 25 dias), mas que não ficavam gestantes repetidamente (após pelo menos três tentativas), apesar da ausência de anomalias anatómicas aparentes ou doenças infecciosas (Dochi et al., 2008; Yaginuma et al., 2019).

A importância das vacas RB está diretamente relacionada com a eficiência reprodutiva das explorações. A repetição de ciclos éstricos sem concepção reduz essa eficiência, pois as vacas não conseguem produzir vitelos com a frequência desejada, atrasando a reposição e reduzindo a produtividade da exploração. O processo de tentar, várias vezes, que uma vaca fique gestante, seja por inseminação artificial (IA) ou monta natural, é um processo dispendioso, que consome recursos como hormonas, sémen, tempo e instalações (Bonneville-Hebert et al., 2011; Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012).

Para estimar o custo da síndrome de RB, existem já modelos matemáticos que consideram o valor dos honorários veterinários, custos adicionais com o sémen, despesas com medicamentos, custos de mão de obra, redução na produção de leite, diminuição na produção de vitelos, perdas devido ao refugo e reposição, perdas resultantes de prolongamento do intervalo entre partos e mortes na exploração (Khosa, 2020; Moraes et al., 2021). Estima-se que cada dia em aberto custe cerca de 5 €, e as vacas com RB apresentam um intervalo entre parto e concepção mais longo (187 dias em média) em comparação com vacas saudáveis, que é de 120 dias em média (Yusuf et al., 2010). Esses custos acumulados representam um impacto económico significativo desta síndrome para a produção de bovinos leiteiros. De acordo com De Vries e Marcondes (2020), as falhas reprodutivas, incluindo a síndrome RB, constituem a principal causa de refugo em muitas explorações leiteiras em todo o mundo.

Vacas que não concebem após múltiplas tentativas podem ficar stressadas, o que pode afetar negativamente a sua saúde e bem-estar. O RB também pode ser um sinal de problemas de fertilidade ou saúde numa vaca, o que pode afetar a sua capacidade de produzir leite e vitelos saudáveis. Quanto

mais rápido uma vaca puder conceber após o parto, respeitando o intervalo de espera voluntário, mais longa poderá ser a sua vida produtiva, tanto na produção de leite, como na criação de vitelos (Magnier, 2020).

No decorrer desta revisão bibliográfica, irá ser apresentada e discutida a etiologia e terapêuticas desenvolvidas para esta síndrome multifatorial com grande importância na fertilidade bovina e produção de leite. De facto, para controlo da síndrome de *repeat breeding*, é crucial realizar uma investigação minuciosa para identificar as causas subjacentes, que podem incluir problemas de saúde, nutrição inadequada, distúrbios hormonais, infeções uterinas ou questões de manejo. Resolver estes problemas é fundamental para otimizar a eficiência reprodutiva e a produtividade na fileira dos bovinos leiteiros. As explorações agrícolas precisam de ser altamente eficientes e rentáveis, e a identificação de animais não produtivos é uma prioridade para evitar perdas económicas. A abordagem sistemática na identificação e resolução destas causas é essencial para melhorar o desempenho reprodutivo dos animais e garantir a sustentabilidade e o sucesso económico das explorações.

2. DEFINIÇÃO DE REPEAT BREEDING

Como referido, *repeat breeding* é um termo utilizado na reprodução bovina para descrever vacas que não concebem após vários ciclos de IA ou cobrição (repetidamente não ficam gestantes após pelo menos três tentativas), sendo subdividido em "early repeats" (repetições iniciais) e "late repeats" (repetições tardias). No caso das "early repeats", a mortalidade embrionária ocorre antes do reconhecimento materno da gestação, levando as vacas a retornarem ao estro entre 18 e 22 dias após monta ou IA. Enquanto as "late repeats" ocorrem quando a mortalidade embrionária acontece após o reconhecimento materno de gestação, fazendo com que essas vacas retornem ao estro mais de 25 dias após cobrição ou IA. Como a taxa de perda embrionária é mais alta durante o primeiro ciclo éstrico após reprodução, as "early repeats" são mais comuns do que "late repeats" (Dochi et al., 2008; Yaginuma et al., 2019; López-Gatius et Garcia-Ispuerto, 2020).

3. CAUSAS DE REPEAT BREEDING

O desempenho reprodutivo bem-sucedido em vacas depende da interação complexa de diferentes fatores, incluindo padrões hormonais, dinâmica ovárica, comportamento de estro, funções uterinas e

acasalamento ou IA. Vários fatores endógenos que atuam no ovário, no oviduto ou no útero podem afetar a qualidade do ovócito e do embrião, influenciando assim a incidência de RB em vacas leiteiras. A síndrome de RB é complexa. Autores como Salasel, Mokhtari et Taktaz (2010) apontam infecções no trato reprodutivo e inflamação uterina crônica como contribuintes, enquanto Sood et al. (2015) identificam desequilíbrios hormonais. O manejo inadequado, incluindo a nutrição inadequada e as falhas na detecção do estro, também contribuem significativamente (Wathes et al., 2004; Walsh et al., 2011). Além disso, o stress térmico, proveniente de condições climáticas extremas (Ferreira et al., 2011) ou ambientes inadequados e stressantes na produção (Magnier, 2020), também contribuem para esta síndrome. Sartori, Bastos et Wiltbank (2010) e Nowicki (2021) destacam que a falha na fertilização e a morte precoce do embrião são eventos-chave, sendo influenciados por diversos fatores resumidos na Figura 1.

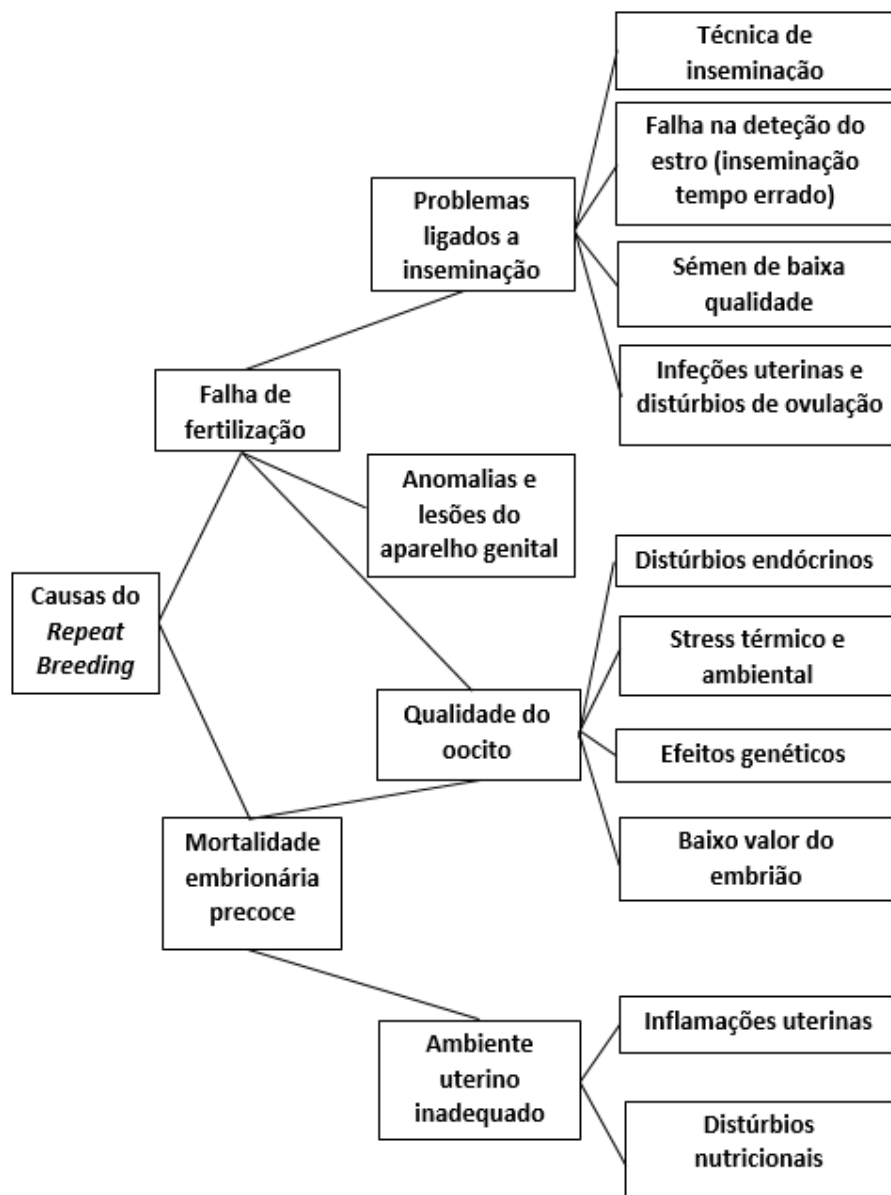


Figura 1: Causas do *repeat breeding* (Adaptado de Nowicki, 2021).

3.1. PROCEDIMENTOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INCORRETOS

A IA é uma técnica comum usada na reprodução em bovinos leiteiros, mas vários problemas podem surgir, impactando na eficácia reprodutiva, e originando RB (Walsh et al., 2011). Hanzen et al. (1999) identificou uma maior frequência de mortalidade embrionária em animais inseminados (mais de três vezes superior) quando comparados com a cobertura natural. Estes autores reportaram que novilhas com RB apresentam uma percentagem significativamente maior de embriões degenerados ou

anormais em comparação com novilhas normais. Numa exploração, a identificação de mais de 15% de animais inseminados mais de duas vezes sugere infertilidade de grupo e a causa deve ser investigada.

Por exemplo, a aplicação inadequada da técnica de IA por deposição incorreta do sémen no trato reprodutivo da vaca ou no momento errado do ciclo éstrico pode levar à não concepção (Sartori, Bastos et Wiltbank, 2010). A identificação precisa do estro é crucial, e a IA deve ser realizada durante o período de recetividade sexual da vaca: dura de 8 a 18 horas. A ovulação ocorre por volta das 28h após o início do estro (+/- 6h) e o ovócito tem uma vida de 8 a 12 horas. Por outro lado, os espermatozoides têm uma viabilidade média de 30 horas e para alcançarem a maior capacidade de fertilização, devem permanecer pelo menos seis horas na região do istmo. Assim, a deposição de sémen 12 horas após o início do estro assegura o encontro de um espermatozoide com capacidade fertilizante e um ovócito com o máximo potencial para desenvolver um embrião saudável (Diskin, 2018). A regra AM/PM é a prática mais comum nas explorações leiteiras. Assim, quando uma fêmea é identificada em comportamentos de estro pela manhã, esta é inseminada à noite, e vice-versa. Caso seja possível realizar uma palpação retal antes da IA e a textura do folículo indicar que se está distante da ovulação, a IA dupla é recomendada, separada por 12 horas (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012). As vacas com RB apresentam frequentemente estros com duração inferior a 6 horas, sugerindo que o tempo de espera antes da IA deve ser reduzido. No entanto, algumas destas vacas podem apresentar atraso na ovulação, tornando difícil determinar o momento exato da mesma, o que frequentemente leva a inseminações não fertilizantes, seguidas por refugo por infertilidade (Descoteaux, 2012). Classicamente, a observação de comportamentos de estro é realizada no mínimo duas vezes por dia (pela manhã e ao final da tarde), com um período de 30 minutos para cada observação. Deve ser realizada por pessoas qualificadas, sendo crucial para melhorar os índices de gestação. Além disso, poderão ser utilizados rufiões para auxiliar na deteção de fêmeas em estro. Atualmente existem alguns métodos auxiliares, como pedômetros, que registram a atividade da vaca, bem como bastões coloridos e detetores eletrónicos que indicam o estro, como o “heat watch” e o “chin ball” (Fesseha et Degu, 2020). A má deteção do estro é uma das principais causas de RB e infertilidade em bovinos (Pérez-Marín et España, 2007). Inseminadores experientes identificam o estro através de comportamentos como aumento de atividade e tentativas de monta. Sinais comportamentais e físicos incluem micção frequente, cauda levantada e mudanças externas visíveis na região genital, como edema e congestão vulvar, e corrimentos mucosos (Iftikhar et al., 2009).

O técnico responsável pela IA deve receber formação adequada. Além disso, é fundamental manter boas práticas de manipulação do equipamento de IA para evitar a sua contaminação e a introdução de agentes infecciosos no trato reprodutivo da vaca, com efeitos prejudiciais à reprodução: vacas com infecção uterina no início do período pós-parto geralmente têm concepções mais baixas na reprodução subsequente (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012). Assim, deve lavar bem as mãos e usar luvas limpas durante o procedimento. O equipamento de IA como o pistolet de IA, deve estar em boas condições de funcionamento e devidamente limpo e desinfetado entre utilizações. A vulva da vaca deve ser mantida limpa e deve evitar-se a entrada de fezes na vagina durante a IA (Selk, 2004). A realização de exames veterinários para avaliar a saúde reprodutiva de vacas não gestantes pode ajudar a identificar problemas, como infeções uterinas ou problemas estruturais, que podem causar *RB*.

A inserção do pistolet deve ser realizada suavemente, evitando lesões no trato reprodutivo da vaca (o sangue é espermicida, portanto, se a IA provocar mesmo que um leve sangramento, a fertilidade do sémen é comprometida) e o sémen deve ser depositado no útero (Selk, 2004). Gebremedhin (2008) destacou que o local de deposição do sémen é um fator importante no sucesso da IA em bovinos, ou seja, a deposição de sémen no corpo uterino resultou numa taxa de não retorno 10% maior do que a deposição cervical. As vacas são inseminadas principalmente no corpo uterino. Quando o sémen é depositado no colo do útero ou introduzido mais profundamente, a fertilidade pode ser bastante reduzida. No primeiro caso, o sémen não consegue subir corretamente até aos cornos uterinos e no segundo caso, a IA pode causar danos aos cornos, prejudicando a fertilidade. A redução da fertilidade é a consequência de ambos os erros mencionados (O'Connor, 2003).

Por outro lado, o sémen de baixa qualidade, caracterizado por baixa concentração e/ou baixa motilidade, pode resultar em falha de fertilização (Sartori, Bastos et Wiltbank, 2010). A armazenagem e o manuseamento adequados do sémen são essenciais para manter a sua viabilidade, e qualquer problema durante o armazenamento ou descongelação pode afetar a eficácia da IA (Selk, 2004). Além disso, as vacas detetadas em estro devem ser inseminadas usando sémen descongelado a 37°C por 30 segundos (Iftikhar et al., 2009).

Para identificar problemas precocemente, é essencial manter registos detalhados de todas as inseminações, incluindo informações como a data, o touro utilizado e outros dados relevantes sobre a vaca. No entanto, para maximizar as hipóteses de sucesso na IA, diminuir o *RB* e melhorar a eficiência reprodutiva em explorações de vacas leiteiras, é também essencial proporcionar condições de manejo

adequadas, incluindo nutrição balanceada, alojamento confortável, ambiente com o mínimo de stress, e ter um acompanhamento por um médico veterinário (Selk, 2004).

3.2. PATOLOGIAS UTERINAS: FATORES DE RISCO E CONSEQUÊNCIAS NA FERTILIDADE

As patologias uterinas, como metrites e endometrites, impactam gravemente a saúde reprodutiva das vacas leiteiras, com redução significativa da fertilidade. Especialmente, o período pós-parto é amplamente reconhecido como primordial para os resultados reprodutivos futuros das vacas, e os distúrbios uterinos são frequentemente associados ao manejo inadequado durante este período (Yusuf et al., 2010). As infecções uterinas têm extrema importância na etiopatogenia da síndrome de RB. Por exemplo, um caso de metrite resultou no aumento de dias abertos ($16,4 \pm 1,2$) e número de inseminações ($0,1 \pm 0,0$) por concepção na exploração (Mahnani, Sadeghi-Sefidmazgi et Cabrera, 2015).

A endometrite, especialmente subclínica, é uma condição frequentemente presente em vacas com RB. Evidências indicam um aumento na mortalidade embrionária, relacionado a danos endometriais, aumento de toxinas bacterianas e de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e citocinas (Sheldon et al., 2006; Salasel, Mokhtari et Taktaz, 2010). A retenção da placenta, outra condição uterina, também desencadeia inflamação e infecções, prejudicando a regeneração uterina e a capacidade de concepção. Esta condição é frequente no puerpério, e deve ser considerada como um sinal clínico de várias outras condições que podem ter origem infecciosa (aborto), metabólica (hipocalcemia, cetose, síndrome da vaca gorda), deficiências nutricionais (selênio e vitamina E) e erros de manejo (intervenção excessiva no parto) (Hanzen, 2016).

A metrite puerperal, ocorrendo geralmente nos primeiros 10 dias pós-parto, e é caracterizada por involução uterina retardada, secreções fétidas no lúmen uterino e sinais de doença sistêmica, como temperatura retal elevada. Fatores de risco incluem partos distócicos, retenção de placenta, condição corporal inadequada, stress de manejo e nutrição inadequada. A metrite pode afetar a saúde do útero e a sua capacidade de cicatrizar e recuperar normalmente após o parto, prolongar o anestro pós-parto, resultando num retorno mais lento à ciclicidade reprodutiva e menor taxa de concepção durante a IA (Selk, 2004; Drillich et Wagener, 2018; Markos, Aloto et Geinoro, 2019).

A endometrite, diagnosticada pela presença de secreção vulvar purulenta ou mucopurulenta três semanas após o parto, e a endometrite crônica não estão associadas a temperatura elevada e os animais não apresentam sinais sistêmicos de doença ou atitude deprimida. Embora o termo

endometrite esteja bem estabelecido para vacas com corrimento vaginal, há evidências claras de que a origem do pus na vagina nem sempre é o endométrio, mas também pode ser o colo do útero ou a vagina. Para definição e diagnóstico de endometrite subclínica ou citológica, são retiradas amostras citológicas do endométrio para determinar a percentagem de células polimorfonucleares (PMN) nos esfregaços. Uma proporção de 5% de PMN pode ser considerada diagnóstica para endometrite subclínica. Está associada a fatores como assistência ao parto, balanço energético negativo pré e pós-parto, hipocalcemia, entre outros (Drillich et Wagener, 2018; Markos, Aloto et Geinoro, 2019). A prevalência de endometrite clínica varia, afetando cerca de 10% a 27% das vacas leiteiras (Barański et al., 2013). A avaliação do microbioma vaginal revela potencial para intervenções terapêuticas na síndrome de RB. Proteobactérias foram encontradas em vacas subfêrteis, associadas à disbiose durante o período pós-parto, e uma abundância de *Porphyromonas* e *Pasteurellaceae* foi encontrada na síndrome de RB. As bactérias associadas mais frequentemente a processos inflamatórios são *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *Escherichia coli* (Martins et Borges, 2011; Moreno et al., 2022).

As hormonas esteróides ováricas estimulam a produção local de fatores de crescimento e os seus recetores, regulando, assim, a função uterina. Estudos, como o de Katagiri et al. (2004), destacam a importância do fator de crescimento epidérmico (EGF) na função uterina, observando alterações na produção de EGF em vacas com síndrome de RB. Foi também observada a normalização dos perfis de EGF após o tratamento para restaurar a fertilidade dessas vacas. Níveis anormais de EGF foram associados à disfunção uterina, sendo a análise dos níveis de EGF (entre os dias 3 e 14 de gestação) considerada útil no diagnóstico de vacas com RB. Variações nesses níveis podem indicar assincronia entre o útero e o blastocisto, afetando o desenvolvimento embrionário (Katagiri et al., 2004; 2006).

As principais hormonas envolvidas na defesa uterina são a prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), estrogénios ($E2$) e progesterona ($P4$). A $P4$, com propriedades imunossupressoras, retarda a involução uterina, predispondo o útero a infeções. A $PGF2\alpha$, pró-inflamatória, (promovendo a síntese de leucotrienos $B4$ que atraem células de defesa) está elevada nos primeiros sete dias pós-parto, e estimula a involução uterina. Assim, como esta é essencial para a involução uterina, são utilizados análogos de $PGF2\alpha$ no tratamento de infeções uterinas pós-parto (Martins et Borges, 2011). Em vacas com endometrite subclínica, as concentrações de $PGF2\alpha$ foram significativamente mais baixas em comparação com vacas saudáveis, indicando uma relação entre esta hormona e a saúde uterina (Barański et al., 2013).

A contratilidade uterina é crucial para facilitar a progressão dos espermatozoides, eliminar conteúdos uterinos anormais e superar inflamações. Comprometimentos na contratilidade podem reduzir a fertilidade, evidenciando a importância deste mecanismo. Acumulação de líquido no lúmen uterino pode interferir na implantação do embrião (Jaureguiberry et al., 2017). Durante o estro, o aumento do E2 promove o fluxo sanguíneo uterino, estimula a produção de muco e facilita a contração do miométrio, contribuindo para a defesa uterina contra infecções (Martins et Borges, 2011).

O diagnóstico da RB em vacas leiteiras envolve diversas abordagens, como avaliação vaginal, palpação transretal, ecografia, testes hormonais, citologia endometrial ou culturas bacterianas uterinas (Sharma, 2015). Estratégias terapêuticas incluem otimização do momento da IA, tratamentos hormonais, tratamento de infecções por meio de infusão de antibióticos, antissépticos ou lavagem uterina e uso de antibióticos sistêmicos (Azawi, 2008). Além disso, a prevenção de inflamações uterinas e a preservação da fertilidade requerem boas práticas de manejo, nutrição adequada e monitorização regular da saúde reprodutiva das vacas. Isso inclui manter instalações limpas (evitar a exposição a fontes potenciais de infecção, como a água contaminada ou áreas sujas), reduzir o stress físico e emocional, e detectar precocemente casos de retenção placentária e patologias uterinas, contribuindo para a prevenção de problemas reprodutivos.

3.3. ANOMALIAS E LESÕES CONGÊNITAS OU ADQUIRIDAS DO APARELHO REPRODUTOR

O sistema reprodutor das vacas desempenha um papel crucial na fertilidade e concepção bem-sucedidas. Diversas anomalias e lesões neste sistema contribuem para a síndrome de RB, afetando a saúde reprodutiva das vacas leiteiras. Uma avaliação reprodutiva adequada é essencial para descartar doenças congênitas ou defeitos adquiridos relacionados com essa síndrome (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012).

Endometrite e metrite crônicas podem resultar na regeneração inadequada do útero, tornando-o menos receptivo à implantação do embrião. Além disso, a presença de pus no útero pode dificultar a implantação e a sobrevivência do embrião, contribuindo para o RB (Shresta et al., 2004). Mudanças na mucosa vaginal (cor, brilho) refletem condições gerais, enquanto inflamações podem ter origens nos fatores físicos (parto, exploração manual, pneumovagina, urovagina, corpo estranho) ou infecciosos. Algumas fêmeas podem ter cérvix duplo ou, pelo contrário, ausência de cérvix e hipoplasia ou aplasia dos cornos uterinos (fêmeas free-martin). A consistência pastosa do útero ao exame retal é um sinal

de infecção uterina. A parede uterina pode apresentar formações cicatriciais. A mobilidade pode estar diminuída devido a aderências formadas entre o omento maior, a parede abdominal e/ou órgãos adjacentes (após cesariana, por exemplo). A salpingite frequentemente leva à obstrução do oviduto, pois causam espessamento dos ovidutos e protuberâncias irregulares. Durante a hidrossalpinge ou piossalpinge, observa-se um aumento do seu diâmetro com consistência líquida ou pastosa. Estas salpingites são por vezes acompanhadas de bursite ovárica, o que leva à formação de aderências e predispõe à acumulação de líquidos (Sharma, 2015; Hagen et Nouvel, 2020).

Anomalias anatómicas, como os septos uterinos, interferem na capacidade do útero de suportar uma gestação normal, podendo dificultar a implantação do embrião ou levar a abortos recorrentes. Aderências uterinas, resultantes de lesões ou inflamações anteriores, prejudicam a expansão adequada do útero durante a gestação. Tumores, como pólipos ou fibromas, podem interferir no desenvolvimento fetal ou bloquear o trato reprodutivo, levando a problemas de concepção e abortos recorrentes (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012). A estenose cervical, caracterizada pelo estreitamento do cérvix do útero, dificulta a passagem do sêmen e a entrada dos espermatozoides no útero, resultando em problemas de fertilização e concepção (Sharma, 2015; Garrido et al., 2020). Distúrbios infeciosos alteram o pH vaginal e a flora bacteriana, afetando a vitalidade espermática. Defeitos de conformação como a urovagina e pneumovagina, e infeções, como a vaginite também podem modificar a função reprodutiva normal (Perez-Marin et al., 2012; Sharma, 2015). Quistos ováricos, com diâmetro superior a 2,5 cm, afetam 5 a 10% das vacas, principalmente no pós-parto (Hagen et Nouvel, 2020).

A identificação e tratamento adequado dessas anomalias são essenciais para resolver problemas de RB. A assistência de um veterinário experiente, utilizando exames clínicos, ecografia e outras avaliações, é recomendada para identificar a causa subjacente. Monitorizar o desempenho reprodutivo, acompanhando o ciclo éstrico, datas de IA e resultados, é crucial (Hagen et Nouvel, 2020).

Outras estratégias poderão ter por base a manutenção do ambiente limpo e a redução do risco de contaminação, bem como a tentativa de evitar um manejo agressivo e implementar programas de prevenção de lesões. O tratamento pode envolver terapias antimicrobianas, procedimentos cirúrgicos ou tratamentos hormonais. Após o tratamento, permitir a recuperação uterina adequada antes das inseminações é essencial. A revisão do protocolo de IA e a escolha de touros são sugeridos para aumentar as possibilidades de concepção. Em casos graves, o refugo ético de vacas com lesões

irreversíveis pode ser considerado para garantir o bem-estar dos animais e a eficiência reprodutiva da exploração.

3.4. ALIMENTAÇÃO

Nas explorações leiteiras de alta produção, há mais de 30 anos que o RB é o segundo problema reprodutivo mais prevalente após o anestro pós-parto. Este fenómeno resulta em perdas económicas significativas para o produtor, refletidas em custos adicionais como inseminações, intervalo entre partos prolongado e aumento nas taxas de refugo de vacas da exploração (Lafi et al., 1992).

A nutrição desempenha um papel crítico na manutenção da eficiência reprodutiva (Khosa, 2020). Está claramente demonstrado que tanto a obesidade como a desnutrição podem levar à disfunção reprodutiva e à subfertilidade, como resultado de uma função metabólica inadequada, intimamente ligada à gestão e homeostasia das reservas adiposas e à função neuroendócrina (Guzel et Tanriverdi, 2014).

A condição corporal (CC) é uma medida indireta do estado nutricional da vaca, avaliando a massa muscular e o nível de gordura corporal, numa escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 obesa. Vacas com CC abaixo de 2,5 podem ter dificuldades para ovular regularmente e conceber, enquanto vacas com CC acima de 3,5 podem ter menor eficiência de ovulação. Nestes casos, o excesso de gordura corporal pode interferir no processo de ovulação, tornando-o menos eficiente. Além disso, estes animais estão predispostos a sofrer de doenças metabólicas (acidose, fígado gordo, cetose, deslocamento do abomaso) que aumentam a incidência de mastite, laminite e endometrite, contribuindo para reduzir a eficiência reprodutiva (Walsh et al., 2011; Jaureguiberry, Madoz et De La Sota, 2015). Manter as vacas dentro da faixa ideal de CC (2,5 a 3,0) é crucial para a eficiência reprodutiva. Uma CC muito alta ou baixa antes do parto é prejudicial, sendo a CC ideal no parto de 3,5 (Wathes et al., 2004). Também deve ser quantificada a perda de CC após o parto: vacas com grande perda de CC entre o parto e as dez semanas após, têm, quando incluídas em programas de produção de embriões, maiores números de embriões degenerados e menores taxas de embriões viáveis. A perda de CC não deve ultrapassar 1,5 e deverão ser tomadas medidas para a recuperar (Carvalho et al., 2012).

Estudos referenciados por Butler em 2003 mostraram que vacas com CC médias (2,75–3,5) ou baixas (<2,5) apresentavam maior prevalência de subfertilidade em comparação com aquelas com CC mais

alta (>3,75). O balanço energético negativo (BEN) nas vacas com CC mais baixa resulta numa redução na libertação hormonal, implicando falhas de fertilização e mortes embrionárias precoces, e como tal maior propensão ao RB. A perda excessiva de peso no pós-parto devido à falta de ingestão adequada de nutrientes neste período, pode levar à perda excessiva de peso corporal e atrasar o retorno à ciclicidade e a ovulação regular. Após o parto, as vacas leiteiras enfrentam uma demanda crescente de energia para produzir leite e recuperar do parto. Se não receberem uma dieta adequada para atender a essas necessidades, podem começar a perder peso rapidamente. O BEN refletiu-se na perda de peso corporal, estando associado a baixos níveis de proteínas, minerais, vitaminas e/ou energia (Butler, 2003).

A pontuação de CC de muitas vacas com RB tende a aumentar à medida que permanecem abertas e, eventualmente, ganham peso nas tentativas subsequentes de reprodução, especialmente na quinta (ou mais) tentativas. As vacas que conseguem ficar gestantes no final do período de lactação têm uma probabilidade maior de serem candidatas ao abate na próxima lactação devido ao risco aumentado de distúrbios metabólicos no seu próximo período periparto (De Vries et Marcondes, 2020).

O BEN ocorre durante o período periparto, principalmente na última semana de gestação e nos primeiros dois meses após o parto. Durante esta fase, as vacas apresentam baixas concentrações séricas de glicose e insulina, o que estimula a mobilização do tecido adiposo, resultando no aumento de ácidos gordos não esterificados (AGNE), utilizadas como fonte de energia. No entanto, níveis elevados e prolongados de AGNE e β -hidroxibutirato podem impactar negativamente o desempenho reprodutivo, levando à anovulação, taxas de gestação reduzidas e maior perda de embriões (Santos, Rutigliano et Sá Filho, 2009), devido aos seus efeitos prejudiciais na imunidade e na saúde pós-parto (Bisinotto et al., 2012; Khosa, 2020). Estudos *in vitro* confirmaram que os AGNEs têm efeitos adversos na síntese de interferão-gama e IgM, bem como na funcionalidade de leucócitos polimorfonucleares (Lacetera et al., 2004). Além disso, deficiências em antioxidantes e vitaminas (A e E), que desempenham um papel na resposta imunológica das vacas, têm sido associadas ao aumento da suscetibilidade a doenças pós-parto (LeBlanc et al., 2004). O BEN reduz a competência oocitária, aumenta a apoptose das células do cumulus, prejudicando a fertilização, a clivagem e o desenvolvimento do blastocisto. Além disso, perturba a função hormonal, alterando a síntese de GnRH, LH e outras hormonas, e resulta numa menor concentração de progesterona (Robinson et al., 2006; Bisinotto et al., 2012).

Além de aumentarem as reservas de energia, os ácidos gordos (AG) afetam a produção de prostaglandinas, a esteroidogênese, a manutenção das propriedades da membrana celular e o metabolismo do colesterol. A suplementação dietética com ácidos gordos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3), normalmente encontrados no óleo de peixe, tem sido recomendada para reduzir a incidência da síndrome RB. Estudos indicam que a administração de PUFA n-3 durante duas semanas antes e depois da IA melhora as funções útero-ovárias e a sobrevivência embrionária em vacas leiteiras pós-parto, pois induz um maior crescimento do folículo pré-ovulatório, níveis mais elevados de progesterona sérica e um aumento na abundância de mRNA de genes estimuladores da produção de interferão (Teeli et al., 2019). Esta suplementação dietética de PUFA n-3 tem ainda efeito antilúteolítico ao inibir a liberação pulsátil de PGF2 α do endométrio e melhora a sobrevivência embrionária (Gulliver et al., 2012). A alimentação com sementes de linhaça ricas em ácido alfa-linolênico durante 28 dias antes da reprodução, induz o aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório e reduz as perdas de gestação em vacas Holstein (Ambrose et al., 2006).

A suplementação com óleo de peixe do 30º ao 160º dia pós-parto reduz a perda da gestação na primeira IA e melhora a taxa global de gestação (Silvestre et al., 2011). Como a mortalidade embrionária precoce é a principal causa de RB em vacas, foram desenvolvidos trabalhos de investigação como aquele de Teeli et al. (2019), sobre o efeito da suplementação dietética de n-3 PUFA (ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA)) óleo de peixe rico de -2 a +2 semanas de IA no tamanho do folículo pré-ovulatório, progesterona sérica e abundância relativa do mRNA dos genes estimulados por interferão que codificam essas proteínas nos leucócitos nas vacas com RB. A dieta do grupo controlo foi suplementada com óleo de palma. Os resultados indicaram que as concentrações séricas de EPA e DHA foram 4,6 e 3,5 vezes maiores, respetivamente, nas vacas RB do grupo com óleo de peixe (Fish oil – FO). O diâmetro do folículo pré-ovulatório foi maior em 2,2mm no grupo FO. No entanto, a progesterona sérica não variou do 14º ao 20º dia após IA, mas os conceptos do dia 20 produziram mais IFN- τ .

Sinedino et al. (2017) relataram que a alimentação com algas marinhas ricas em DHA dentre os dias 27 a 147 pós-parto regulou positivamente genes estimulados pelo IFN nos leucócitos do sangue periférico e aumentou a taxa de gestação em vacas primíparas e múltíparas, o que foi atribuído ao melhor desenvolvimento do conceito com produção aumentada de IFN- τ .

De acordo com Pérez-Marín e Quintela (2023), a leptina, uma proteína produzida pelos adipócitos e modulada por diferentes fatores, incluindo a insulina, glicocorticoides e esteroides sexuais, desempenha um papel essencial ao fornecer informações ao cérebro sobre as reservas de energia disponíveis. Além disso, esta hormona inibe a produção do neuropeptídeo hipotalâmico, um poderoso fator estimulante do apetite. Um estudo realizado durante o período pós-parto relatou concentrações mais baixas de leptina nas vacas com RB em comparação com vacas férteis (Guzel et Tanriverdi, 2014). O reinício da atividade ovárica depende do manejo adequado durante o período pós-parto (Mann et al., 2005). Níveis baixos de leptina podem induzir comportamento de jejum alimentar, resultando na redução do consumo alimentar, e alteração da função ovárica, devido à redução dos recetores de LH e da síntese de estrogénios pelas células da granulosa (Odle et al., 2018). A manutenção ou aumento de CC, entre o dia da IA e o dia 30 depois, está associada a uma maior fertilidade em comparação com aquelas que perdem CC nesse período. Mudanças na CC estão positivamente correlacionadas com as concentrações séricas de insulina, IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina tipo I) e leptina. Estas hormonas atingem o hipotálamo e modificam a frequência de secreção do GnRH e, consequentemente, de LH.

A nutrição pode influenciar os níveis de insulina e vários fatores de crescimento, que impactam no desenvolvimento folicular, a esteroidogénese, a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário, aumentando assim a incidência de RB. Com base nesse entendimento, a insulina tem sido sugerida como uma terapia alternativa para atenuar as falhas reprodutivas. Vacas tratadas com insulina de ação prolongada nos dias 8, 9 e 10 do ciclo éstrico tiveram um incremento ligeiro no desempenho reprodutivo, mas os efeitos benéficos não foram claramente demonstrados (Pérez-Marín et Quintela, 2023).

Por outro lado, a produção excessiva de moléculas oxidantes e a deficiência de substâncias antioxidantes (como selénio, vitamina E e β -carotenos) leva à acumulação de ROS e a danos celulares, conhecido como stress oxidativo, que com efeitos deletéricos na eficiência reprodutiva, reduz a síntese de hormonas esteroides, a taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. A suplementação com substâncias antioxidantes, antes e depois do parto, tem mostrado reduzir complicações puerperais e melhorar a fertilidade em vacas leiteiras de alta produção. Além disso, a inclusão de β -carotenos na dieta beneficia a fertilidade em vacas sob stress térmico (Da Silva, 2022).

Recomendações para prevenir problemas de RB envolvem práticas de manejo alimentar adequadas, o que inclui uma dieta equilibrada, monitorização da CC das vacas, evitar perda excessiva de peso pós-parto, suplementar nutricionalmente quando necessário e gerir efetivamente o stress térmico. A colaboração com nutricionistas animais e a implementação de estratégias de manejo nutricional durante o período de transição são fundamentais para garantir a saúde reprodutiva das vacas. Vacas bem alimentadas têm maior probabilidade de manter a CC ideal, promovendo uma saúde reprodutiva robusta e, consequentemente, reduz a incidência de RB e melhora o desempenho reprodutivo nas explorações leiteiras.

3.5. MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE

A mortalidade embrionária, responsável por uma considerável taxa de falha reprodutiva em ruminantes, apresenta uma variação entre 20% e 50% (Diskin et Morris, 2008). A mortalidade embrionária precoce é comum em bovinos leiteiros, representando a perda de embriões nos estadios iniciais, geralmente antes do reconhecimento materno da gestação e antes da deteção da gestação por ecografia (Kowalczyk, Czerniawska-Piátkowska et Wrzecińska, 2021). A incidência desse fenómeno varia de 10,6% a 39,7% (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012). Em vacas leiteiras de alta produção, a taxa de mortalidade embrionária é mais proeminente na primeira semana pós-conceção (Diskin et Morris, 2008). As causas da mortalidade embrionária precoce até o 7º dia após a concepção estão relacionadas com a qualidade inadequada do oócito ou um ambiente uterino desfavorável, associado a fatores como nutrição, stress térmico, desequilíbrios endócrinos e doenças uterinas (Souza et al., 2014).

Apesar de o desenvolvimento embrionário em bovinos se estender até o 45º dia de gestação, a mortalidade embrionária precoce, entre 0 e 18 dias, contribui significativamente para 70% a 80% das perdas totais. Esta mortalidade não altera a duração do ciclo éstrico (Hanzen et al., 1999).

O reconhecimento materno da gestação em bovinos é um processo fisiológico em que o concepto sinaliza a sua presença ao sistema materno, prolongando a vida do corpo lúteo (CL). O IFN- τ desempenha um papel crucial, estimulando genes e regulando fatores essenciais para a preparação uterina para a implantação e o desenvolvimento fetal. A atividade antilúteolítica do IFN- τ mantém a função do CL e secreção de progesterona, essencial para o crescimento embrionário e fetal. A falha dos efeitos antilúteolíticos do IFN- τ é uma das principais causas de mortalidade embrionária em

bovinos. As células trofotodermicas mononucleares de embriões de ruminantes secretam IFN- τ , com propriedades antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. O alongamento do embrião é crucial para garantir a secreção adequada de IFN- τ e o reconhecimento materno, enquanto falta de alongamento pode implicar a perda do embrião. Assim, o alongamento também visa aumentar a área máxima de troca vascular com os tecidos maternos após a implantação (Robinson et al., 2006; Kowalczyk, Czerniawska-Piątkowska et Wrzecińska, 2021).

A regulação da composição do ambiente uterino é também imprescindível, devendo existir um aumento significativo de glicose, proteína total, e equilíbrio no cálcio, magnésio e potássio. Nos animais RB, foram observadas concentrações uterinas mais baixas de proteína, sódio, fósforo, glicose, mas maiores concentrações de cálcio, potássio e magnésio do que em animais normais (Hanzen et al., 1999).

Fatores como desequilíbrios hormonais, especialmente baixas concentrações de progesterona durante a fase lútea, são suspeitos de contribuir para o RB. Os resultados obtidos no estudo de Husnurrizal et al. (2021), mostraram que a concentração de progesterona nas vacas normais foi maior do que nas vacas RB, o que pode ser a razão pela qual as vacas normais conseguiram manter a gestação. Altas concentrações de progesterona estão intimamente relacionadas ao processo de alongamento do concepto em bovinos e ao aumento da produção de IFN- τ . A concentração significativamente maior de progesterona nas vacas normais no 15º dia pós-IA pode contribuir para o sucesso na concepção, promovendo o crescimento embrionário enquanto vacas que não conseguem conceber normalmente apresentam uma diminuição de P4 no 15º dia pós-IA. A suplementação de P4 tem mostrado aumentar as taxas de gestação em vacas com RB. Um nível alto de progesterona estimula o crescimento embrionário durante esta fase crítica da gestação.

Além disso, também contribuem para a síndrome RB, fatores como a baixa qualidade do sêmen, tempo inadequado de IA, deficiências nutricionais, disfunções imunológicas (podem resultar na rejeição do embrião pelo organismo da mãe), infecções uterinas, stress físico, anomalias genéticas e até mesmo o stress emocional das vacas podem afetar negativamente o desenvolvimento embrionário e contribuir para a mortalidade embrionária (Selk, 2004; Sheldon et al., 2006; Sartori, Bastos et Wiltbank, 2010; Souza et al., 2014; Magnier, 2020).

É importante destacar que a mortalidade embrionária precoce é um fenômeno natural na reprodução animal, onde a seleção natural atua para eliminar embriões não viáveis. No entanto, quando a taxa de

mortalidade embrionária é excessivamente alta, é imperativo realizar investigações detalhadas para identificar as causas específicas e implementar medidas de manejo e saúde reprodutiva para minimizar impactos negativos na eficiência reprodutiva da exploração.

3.6. PERFIL HORMONAL ASSOCIADO À SÍNDROME DE RB

Diversos estudos destacaram a relação entre os níveis de cortisol e azoto ureico no sangue e a ocorrência de RB em vacas leiteiras. Diah et al. (2019) observaram que vacas RB apresentavam níveis significativamente elevados de cortisol em comparação com vacas férteis: o grupo de RB ($6,860 \pm 1,427$ ng/mL) e o grupo fértil ($3,145 \pm 1,103$ ng/mL) (normal: 3.8-4.4 ng/mL). Além disso, os níveis de azoto ureico (BUN) também foram maiores em vacas RB ($31,45 \pm 4,70$ mg/dL) do que em vacas férteis ($27,30 \pm 2,69$ mg/dL). Esses resultados sugerem que altos níveis desses compostos podem contribuir para a ocorrência de RB em vacas leiteiras.

Prasad et al. (2016) associaram o aumento dos níveis de glucocorticoides, como o cortisol (devido ao stress crónico), com falhas reprodutivas. O stress durante o estro pode levar à secreção aumentada de hormona adrenocorticotropina (ACTH), estimula a libertação de cortisol do córtex adrenal, inibindo a libertação de LH e a produção de estrogénios, o que pode resultar em atraso ou impedimento da ovulação (Singh et al., 2005; Etim et al., 2013; Lucassen et al., 2014). Altos níveis de cortisol também podem comprometer a produção de P4, contribuindo para ciclos éstricos repetidos devido à mortalidade embrionária precoce (Whirlledge et Cidlowski, 2010).

Como referido, a dieta desempenha um papel crucial no ambiente uterino, e o excesso de proteína pode aumentar os níveis de amónia no sangue e no útero das vacas. Estudos como o de Butler (1998) indicam que o aumento de proteínas não degradáveis no rúmen pode aumentar a concentração de amónia, afetando negativamente a fertilidade. A análise de metabolitos sanguíneos, como ureia plasmática, é uma ferramenta útil para avaliar o metabolismo do nitrogénio ruminal e detectar possíveis desequilíbrios no nível de proteína (disponibilidade) que podem interromper a secreção de gonadotrofinas afetando a função reprodutiva (Budiasa et Pemayun, 2015). As concentrações elevadas de ureia plasmática e amónia foram associadas a falhas na gestação (Chaveiro et al., 2011; Bisinotto et al., 2012). Além disso, afeta a progesterona em condições microuterinas (Butler, 2005; Weiner, Mitch et Sands, 2015). Altos níveis de ureia no sangue e no fluido uterino podem impactar negativamente na qualidade do fluido uterino, resultando em efeitos tóxicos no endométrio e

influenciando a expressão génica relacionada à fertilidade (Gunaretnam, Pretheeban et Rajamahendran, 2013). Por outro lado, também demonstraram aumentar a secreção das hormonas PGF2 α e PGE2, o que dificulta a criação de condições ideais para o desenvolvimento embrionário (Butler, 1998).

Barson et al. (2019) destacaram variações significativas nos níveis de glicose, ureia e colesterol em vacas com RB. Níveis mais baixos de glicose sérica foram associados a uma diminuição na taxa de fertilidade. Além disso, níveis elevados de ureia e colesterol estiveram presentes em vacas com RB, sugerindo uma influência direta do estado nutricional na fertilidade e ciclicidade em bovinos. Maior concentração de ureia está relacionada a distúrbios de fertilidade, diminuição do nível de energia, causando perdas económicas (Setiadi, Widyobroto et Rustamaji, 2003).

Alterações na produção e libertação de hormonas esteróides, como estradiol e progesterona, são observadas em vacas com RB. Níveis elevados dessas hormonas durante a ovulação podem levar a disfunção lútea e assincronia entre embriões e o ambiente uterino. Níveis elevados de progesterona antes da ovulação podem causar ovulação retardada, irregular ou ausente. Além disso, a presença de folículos persistentes, caracterizados por níveis prolongados e/ou elevados de estradiol, pode acontecer durante o desenvolvimento de embrião, levando à sua morte precoce. Níveis de progesterona inferiores a 2 ng/mL até o 8º dia pós-ovulação indicam baixa qualidade lútea e aumentam a probabilidade de síndrome de RB (Pérez-Marín et España, 2007). A presença de quistos ováricos em vacas com RB é observada, como resultado de distúrbios hormonais ou uterinos anteriores (Sood et al., 2017). A presença de níveis suprabasais de progesterona perto do estro, geralmente decorrentes de falha parcial da luteólise, pode prolongar o período de crescimento do folículo ovulatório e promover o envelhecimento do oócito, reduzindo assim a sua capacidade para a fertilização (Pérez-Marín et España, 2007; Sharma, 2015). Consequentemente, pode ser observada assincronia entre a IA e a ovulação (que é atrasada ou impedida), desequilíbrios hormonais (estradiol elevado), formação de CL moderado e alterações endometriais (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012). É relatado que as vacas com RB exibem sinais comportamentais de estro mais intensos e níveis mais elevados de estradiol em comparação com vacas férteis, embora o diâmetro folicular seja comparável em ambos os grupos. Isto sugere aumento da atividade esteroidogénica nas vacas com RB, o que poderia afetar negativamente a qualidade e o desenvolvimento dos oócitos. Também foi relatado que

exibem um curto período de proestro e um padrão de secreção de LH moderado antes do pico (Sood et al., 2015).

A baixa concentração de P4, devido ao metabolismo aumentado em vacas de alto rendimento, empobrece o ambiente uterino, afetando o desenvolvimento embrionário inicial, como mencionado anteriormente. A avaliação da concentração de progesterona por volta do dia 19-21 após IA é apontada como um método eficaz para detectar falhas na gestação. O radioimunoensaio (RIA) e o imunoensaio enzimático (ELISA) são as técnicas analíticas usuais para determinação de esteroides em fluidos biológicos, permitindo elaborar estratégias terapêuticas adequadas (Pérez-Marín et al., 2012).

3.7. FATORES DE STRESS QUE INFLUENCIAM A SÍNDROME DE RB

Diversos autores relataram o efeito do stresse térmico e da humidade na redução da fertilidade em vacas RB (Hanzen et al., 1999; Ferreira et al., 2011; Wankhede, 2018). De acordo com De Rensis e Scaramuzzi (2003), as altas temperaturas modificam a dinâmica folicular ovárica, levando a codominância folicular, diminuindo a duração do ciclo éstrico e a competência dos oócitos para se tornarem blastocistos. Vacas RB mostraram maior sensibilidade ao stresse térmico, evidenciada por maior fragmentação de blastocistos durante o verão. Um ambiente quente também foi associado a um número reduzido de cópias de DNA mitocondrial e aumento da apoptose em oócitos de vacas RB (Ferreira et al., 2011). Esta situação é preocupante face às presentes alterações climáticas com aumento da intensidade e duração das ondas de calor prejudicando a eficiência reprodutiva (Capela et al., 2022). A diminuição na taxa de concepção durante a estação quente pode variar entre 20 e 30% em comparação com a estação de inverno. A transferência de embriões em vacas RB foi sugerida como uma abordagem para atenuar estes efeitos negativos. Podem também ser tomadas outras estratégias para mitigar o stresse térmico que incluem sombreamento, ventilação forçada, banhos em tanques, aspersão de água, e aumento da disponibilidade de água para abeberamento (De Rensis et Scaramuzzi, 2003; Wankhede, 2018; Reddy et al., 2023). Por outro lado, o stresse térmico pode reduzir os sinais de cio pela redução dos níveis de estrogénio no verão comparativamente ao inverno, ou pela redução do nível de LH. O aumento da temperatura exterior foi associado a mais oócitos não fertilizados e embriões degenerados. O embrião de bovino é mais sensível ao aumento da temperatura durante as primeiras 24 horas, mas o stresse térmico também afetou a síntese de trofoblastina e aumentou a produção de prostaglandinas pelo endométrio e pelo embrião (Hanzen et al., 1999; Kawano et al., 2022).

O stresse em novilhas e vacas pode ser desencadeado por situações imprevisíveis ou fora de controlo e é cumulativo. Assim, impacta no seu metabolismo, aumentando as necessidades energéticas em detrimento da síntese do leite, da musculatura e do sistema imunológico. Vários fatores podem induzir stress, como mudanças bruscas no consumo de alimento, falta de água ou alimento, transporte, manejo, vacinação, desparasitação, primeiro parto, primeira ordenha, e fatores ambientais como variações de temperatura, humidade, luz, ventilação. São também de considerar os fatores sociais como mudanças de grupo, isolamento, densidade animal, desmame e fatores ligados as patologias. Todos eles podem levar à redução da fertilidade e fecundidade, aumento da suscetibilidade a doenças, redução da ingestão e ruminação e comprometimento do desempenho zootécnico (Magnier, 2020).

4. NOVAS ESTRATÉGIAS APLICADAS NO CONTROLO E PREVENÇÃO DE REPEAT BREEDING

4.1. INTERVENÇÕES GENÉTICAS

A redução do RB por meio de intervenções genéticas é uma área de investigação importante na pecuária leiteira, enfrentando desafios complexos devido à interação entre fatores genéticos e ambientais. Estratégias de abordagem incluem a seleção criteriosa de touros com base em avaliações de fertilidade, considerando o desempenho reprodutivo das filhas. Além disso, a identificação de marcadores genéticos associados à resistência a doenças reprodutivas, qualidade do sêmen, resistência ao stress térmico e genes relacionados com a saúde uterina são consideradas para aprimorar a eficiência reprodutiva (Boichard, 2023). As tecnologias genómicas, como a seleção genómica, podem ser usadas para identificar animais com características reprodutivas desejáveis com base no seu perfil genético.

A concepção do primeiro serviço e a taxa de gestação são usadas para indicar a fertilidade em novilhas. A seleção genética, embora desafiante devido à baixa heritabilidade de características reprodutivas femininas e à natureza poligénica das características de fertilidade, pretende melhorar a fertilidade em novilhas e nas explorações. A implementação de práticas de manejo adequadas aumenta a probabilidade de sucesso reprodutivo (Peters et al., 2013; Dickinson et al., 2019). A utilização de touros para produzir vitelos maiores pode ser considerada como uma melhoria genética ou, em oposição, como um problema. Isto porque pode ser a causa de partos distócicos ou doenças pós-parto, como metrite, infertilidade ou estro repetido (Pérez-Marín, Moreno et Calero, 2012).

Vacas altamente selecionadas para produção de leite apresentam mudanças metabólicas visando atender às necessidades energéticas durante a lactação. No entanto, essas adaptações podem impactar negativamente a função reprodutiva, resultando em atrasos entre o parto e a primeira ovulação. A influência genética na baixa fertilidade dos efetivos leiteiros é menor em comparação com fatores relacionados com a intensificação do manejo nas explorações modernas (Da Silva, 2022).

Anomalias cromossômicas, como translocações 1/29 e 7/21, têm impacto na fertilidade bovina, causando redução significativa na fertilidade (3 a 8%), principalmente a translocação 1/29, que é hereditária, e que pode resultar mais facilmente em mortalidade embrionária do que na ausência de fertilização. Tratamentos de fertilização *in vitro* ou superovulação podem aumentar a frequência dessas anomalias (Hanzen et al., 1999).

Apesar dos esforços na seleção genética, é crucial destacar que essa abordagem não é uma solução imediata, necessitando de tempo para observar resultados. Assim, a seleção genética deve ser complementada por práticas de manejo adequadas, nutrição balanceada e cuidados veterinários para maximizar a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras. O entendimento da interação complexa entre fatores genéticos e ambientais é fundamental para o desenvolvimento de estratégias integradas e sustentáveis na busca pela redução do RB.

4.2. TRATAMENTO DO RB COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS E LISADO DE PLAQUETAS PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um componente biológico derivado do sangue, concentrando plaquetas após a remoção de células vermelhas e, parcialmente, de células brancas (Zhu et al., 2013). As plaquetas contêm fatores de crescimento, citocinas e metabolitos ativos que melhoram o ambiente endometrial, impactando positivamente a implantação embrionária (Hassaneen et al., 2023). A cultura *in vitro* de células endometriais bovinas com lisado de plaquetas (PL) demonstrou que o PL reduziu fortemente a expressão gênica de fatores pró-inflamatórios (Marini et al., 2016). Em medicina veterinária, o PRP e o PL têm sido utilizados como terapias inovadoras, mostrando resultados promissores (Hassaneen et al., 2023).

Hosseini et al. (2017) investigaram o efeito da injeção intraovárica de PRP autólogo na fertilização *in vitro* (FIV) e formação de blastocistos, observando melhoria na função ovárica em pacientes humanos que receberam PRP intraovárico. Outro estudo avaliou o efeito da adição de PRP ativado (PL alogénico)

na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, no desenvolvimento embrionário e o efeito da infusão intrauterina de PL autólogo nas vacas RB (Hassaneen et al., 2023). Os resultados indicam que o PL alogénico foi eficaz em estimular a maturação *in vitro* e o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos de boa e baixa qualidade (melhorou a taxa de clivagem de oócitos de baixa qualidade e melhorou a taxa de blastocistos em oócitos bovinos de boa qualidade). Pós-inseminação, infusão intrauterina de PL autólogo derivado de PRP com alta contagem de plaquetas foi recomendada para o tratamento de vacas RB, verificando-se que vacas RB gestantes tratadas com PL tiveram uma contagem de plaquetas sanguíneas mais alta do que as não gestantes. Estes autores recomendam o uso *in vivo* de PL autólogo e *in vitro* de PL alogénico como alternativas seguras e benéficas em comparação com terapias sintéticas e hormonais, ressaltando a promissora contribuição do PRP e PL no tratamento de condições reprodutivas adversas, especialmente em bovinos.

4.3. TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E “OVUM PICK UP”

A transferência embrionária (TE) emerge como uma ferramenta crucial na pecuária, visando aumentar o número de animais de alto rendimento e geneticamente superiores (Nowicki, 2021). A TE, ao minimizar os efeitos adversos da baixa qualidade de oócitos e ambientes uterinos desfavoráveis, em vacas com histórico de RB, especialmente durante os primeiros sete dias após a ovulação, melhorou significativamente as taxas de gestação nestes animais (Dochi et al., 2008; Yaginuma et al., 2019).

Diversos estudos exploraram a TE como uma estratégia para aprimorar a fertilidade em vacas RB, obtendo consistentemente taxas de gestação superiores em comparação com IA isolada. Por exemplo, Rodrigues et al. (2007) revelou taxas de gestação substancialmente superiores após TE (41,7%) em comparação com IA isolada (17,9%). Esse incremento foi atribuído ao aumento da liberação de IFN- τ pelos embriões transplantados, apoiando o reconhecimento materno da gestação (Nowicki, 2021). O IFN- τ desempenha um papel crucial (ver 2.5), suprimindo a luteólise e mantendo a gestação ao inibir a liberação de PGF2 α do útero (Spencer et al., 2004). Dochi et al. (2008) investigaram o sucesso da IA isoladamente ou em combinação com a TE. Em vacas RB, a taxa de gestação apenas para IA foi de 30,0% enquanto a IA combinada com transferência de embriões produzidos *in vivo* resultou numa taxa de 52,6%. No estudo de Yaginuma et al. (2019), em 1.122 vacas RB foram implantados embriões FIV após IA anterior. A implantação após a IA resultou numa taxa de gestação de 46,9% em vacas RB. Os embriões adicionados aumentaram a expressão de mRNA de genes estimulados por interferão,

indicando esta via como o principal mecanismo que leva à sobrevivência dos embriões, resultando numa maior taxa de gestação.

A aplicação prática da TE em casos de RB envolve a escolha de vacas dadoras, geralmente aquelas com valor genético elevado, enquanto as novilhas ou vacas saudáveis servem como receptoras dos embriões (Figura 2). Os tratamentos de sincronização do crescimento folicular podem ser classificados em 3 grupos: protocolos com base de estradiol (proibidos na União Europeia), protocolos com base de GnRH e protocolos com base de progesterona (Colazo et Maplefort, 2014). A superovulação (Figura 3) é um passo crítico, envolvendo protocolos com FSH e/ou eCG (*equine chorionic gonadotropin*) para desenvolvimento de vários folículos, seguido por IA e lavagem uterina para obter os embriões (Bó, Cedeño et Mapletoft, 2019; Nowicki, 2021). As fêmeas recetoras têm de estar sincronizadas com a idade dos embriões.

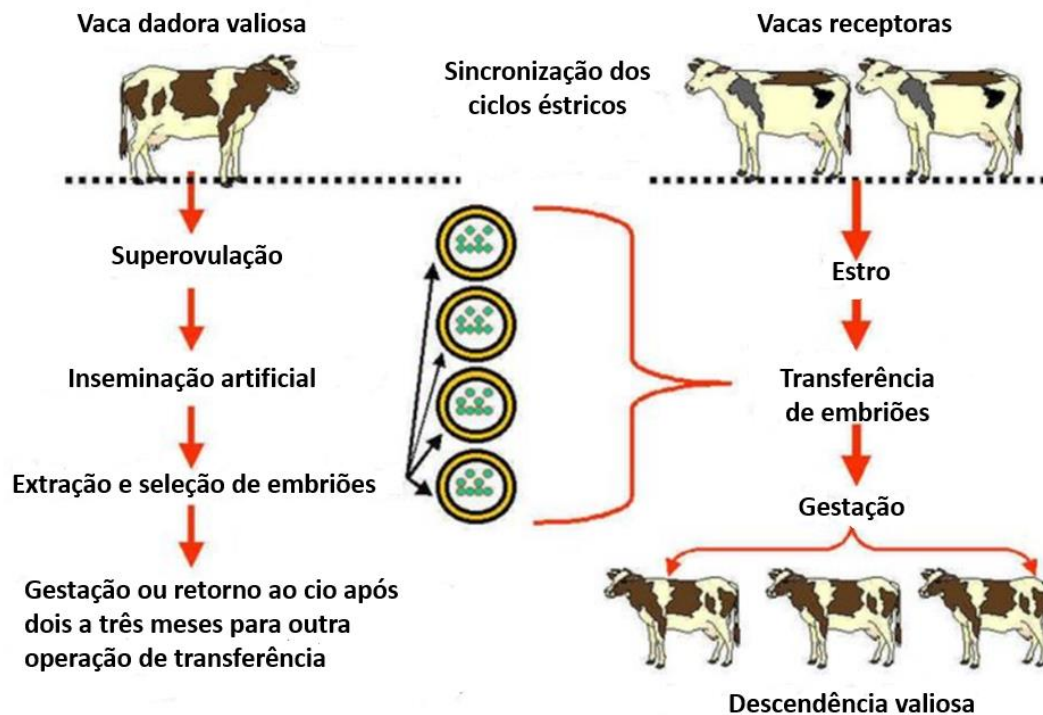


Figura 2: Método da transferência de embriões em bovinos (Adaptado de Rodriguez Jimenez, 2013).

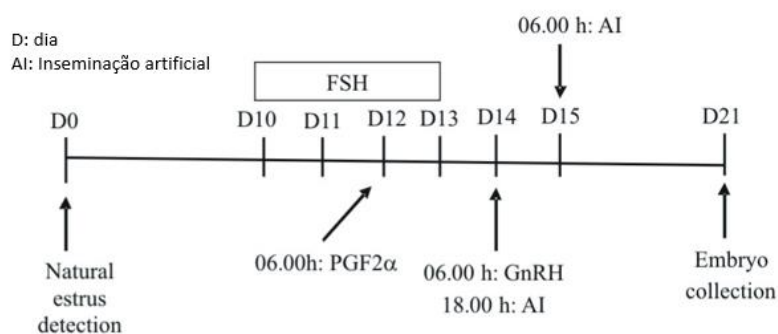


Figura 3: Exemplo de protocolo de superovulação (Ferreira et al., 2014).

Os embriões são colhidos no sétimo dia pós IA da dadora, utilizando técnicas como a lavagem uterina, seguida da recuperação e filtragem da solução tampão enriquecida para obter os embriões. A avaliação da qualidade embrionária envolve critérios morfológicos, como aspecto morfológico, estágio de desenvolvimento e a ausência de degenerescências celulares (Robertson et Nelson, 2009; Pinto, 2022). Após a análise, os embriões podem ser congelados, utilizando crioprotetores, em azoto líquido, ou transferidos para as vacas recetoras. A colocação dos embriões no corno uterino, ipsilateral ao corpo lúteo, segue procedimentos semelhantes à IA, com diagnóstico de gestação realizado aproximadamente aos 30 dias para verificar a implantação (Dufour, 2019). Também se pode fazer a sexagem do embrião por PCR antes da transferência (Ponsart et al., 2007).

Espera-se que 75%–90% das vacas respondam ao tratamento de superovulação. No entanto, 20% a 30% não produzem embriões transferíveis de qualidade. Para vacas que respondem com sucesso ao tratamento com FSH, ainda existe uma variabilidade na produção de embriões de boa qualidade (de 0 a >20 por lavagem). Uma produção de 5 a 7 embriões de boa qualidade (transferíveis) por colheita de embriões é considerado um resultado adequado (Pinto, 2022).

A técnica de "Ovum-pick up" (OPU) associada a FIV permite a produção de embriões *in vitro*. Neste método, uma sonda ecográfica é utilizada para a punção de folículos ovários, seguida pela maturação, fecundação e cultura *in vitro* dos oócitos aspirados até atingirem o estágio de mórula ou blastocisto. A colheita dos oócitos é realizada por punção transvaginal, podendo ser repetida uma ou duas vezes por semana, durante vários meses, sem aparentemente afetar a fertilidade subsequente dos animais. Essa técnica tem vantagens sobre a colheita de embriões *in vivo*, permitindo a produção de blastocistos de fêmeas consideradas inférteis, mantendo assim o pool genético de animais em programas de

seleção genética. A tecnologia de OPU permite obter aproximadamente 5 vezes mais embriões transferíveis por unidade de tempo do que a TE tradicional (Colleau, 2004). Os oócitos assim obtidos entram então no ciclo clássico de maturação – fertilização – cultura *in vitro* até que sejam obtidos embriões viáveis que possam ser congelados ou transferidos em fresco (Ponsart et al., 2007; Hasler et Barfield, 2021). A qualidade dos oócitos é determinada por exame à lupa utilizando critérios morfológicos como o grau de compactação das células do cumulus ou a homogeneidade e opacidade do citoplasma do oócito (Hanzen et al., 1999).

A TE, seja de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, e o OPU representam estratégias valiosas para melhorar a eficiência reprodutiva, contribuindo para programas de seleção e conservação genética assim como para tratamento de vacas RB.

5. CONCLUSÃO

A gestão do *repeat breeding* em vacas leiteiras é um desafio multifacetado que exige uma compreensão abrangente dos diversos fatores envolvidos. A inadequação da IA, patologias uterinas, anomalias do aparelho reprodutor, alimentação inadequada, mortalidade embrionária precoce, perfil hormonal e fatores de stress desempenham papéis significativos na ocorrência do RB. A abordagem diagnóstica e várias soluções possíveis de implementar são resumidas na Figura 4. Lidar com a síndrome de RB necessita de soluções abrangentes e inovadoras: as intervenções genéticas oferecem possibilidades promissoras para melhorar a fertilidade das vacas, enquanto o tratamento com PRP e LP para produção de embriões *in vivo* e *in vitro* representam estratégias emergentes e eficazes. A transferência embrionária e o “ovum pick up” são técnicas avançadas que mostram potencial para superar as limitações associadas ao RB. Investigações recentes têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de alternativas mais eficazes e sustentáveis no manejo do *repeat breeding*. É imperativo continuar a explorar e implementar soluções alternativas, visando otimizar o bem-estar das vacas leiteiras, a sustentabilidade e o sucesso económico das explorações.

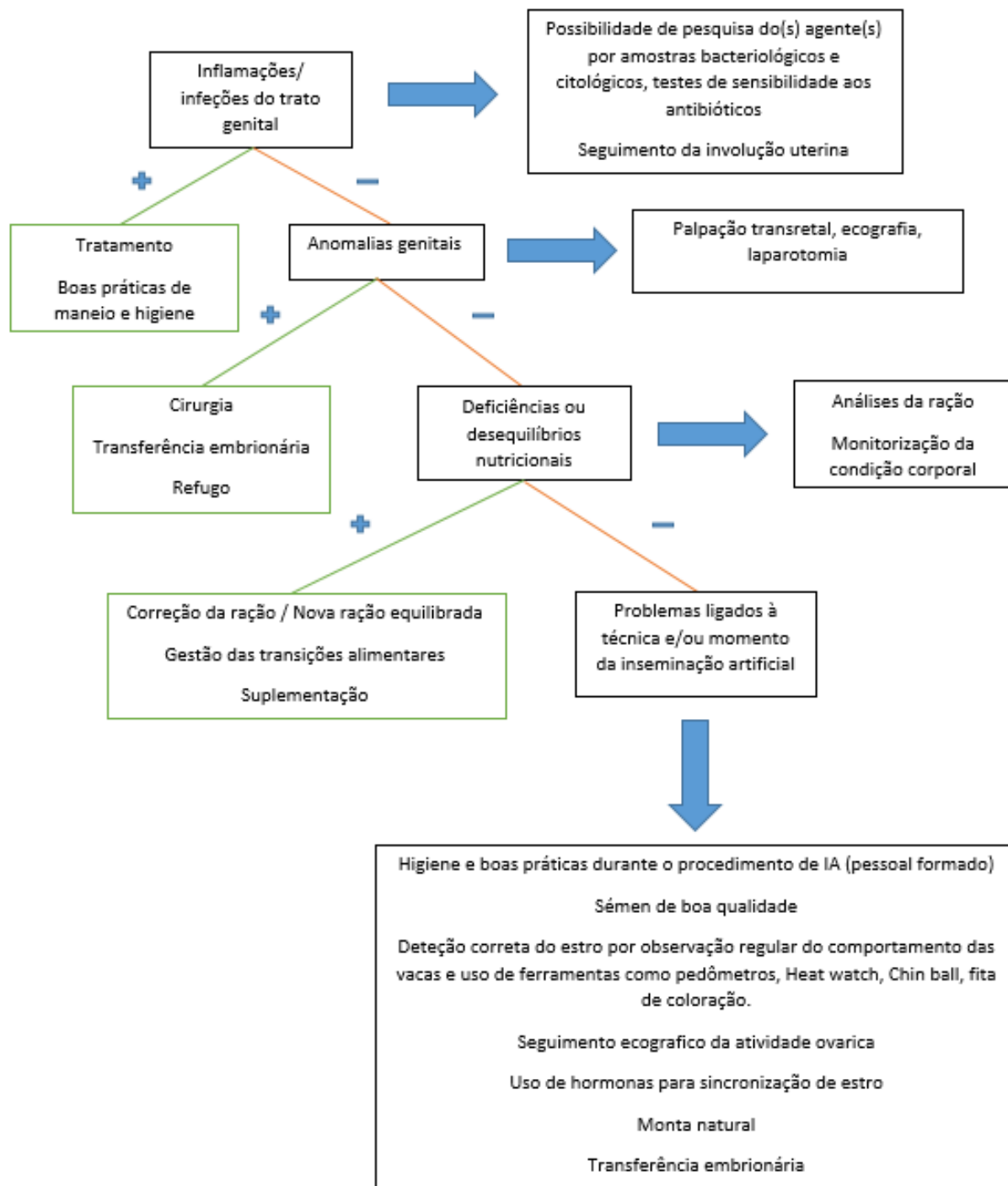


Figura 4: Abordagem diagnóstica ao *repeat breeding*.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambrose, D.J. et al. (2006) '*Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in A-Linolenic acid*', Journal of Dairy Science, 89(8), p. 3066-3074. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72581-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72581-4).
2. Azawi, O.I. (2008) '*Postpartum uterine infection in cattle*', Animal Reproduction Science, 105(3-4), p. 187-208. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.010>.
3. Barański, W. et al. (2013) '*Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis*', Theriogenology, 80(7), pp. 766–772. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.001>.
4. Barson, R.K., Padder, S., Sayam, A.S.M., Rahman, M.M., Bhuiyan, M.M.U., & Bhattacharjee, J. (2019) '*Comparison of serum glucose, urea nitrogen, cholesterol, and total proteins in crossbred repeat breeder and normally cyclic cows*', J Adv Vet Anim Res, 6(1), 82–85
5. Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S., Martinez, N., Lima, F.S., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P. (2012) '*Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows*', Animal Reproduction, 9, 260–272.
6. Bó, G.A., Cedeño, A. and Mapletoft, R.J. (2019) '*Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle*', Animal Reproduction, 16(3), pp. 411–422.
7. Boichard, D. (2023) '*La sélection génomique chez la vache laitière*', Planet-Vie. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/production-agricole-agrosystemes/la-selection-genomique-chez-la-vache-laitiere>
8. Bonneville-Hebert, A., Bouchard, E., Tremblay, D.D., Lefebvre, R. (2011) '*Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec Canada*', Canadian Journal of Veterinary Research, 75(2), 147–51.
9. Budiasa, M.K. and Pemayun, T.G.O. (2015) '*The blood glucose profile and plasma urea in postpartum anestrus of Bali cattle*', Buletin Vet. Udayana, 7, 48-52.
10. Butler, W.R. (1998) '*Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle*', Journal of Dairy Science, 81, 2533-2539.
11. Butler, W. R. (2003) '*Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows*', Livestock Production Science, 83(2-3), 211-218.
12. Butler, W.R. (2005) '*Relationships of dietary protein and fertility*', Advances in Dairy Technology, 17, 159-168.

13. Capela, L. et al. (2022) '*Impact of heat stress on bovine sperm quality and competence*,' Animals, 12(8), p. 975. <https://doi.org/10.3390/ani12080975>.
14. Carvalho, P.D. et al. (2012) '*Effect postpartum body weight change and circulating NEFAS on embryo production in superovulated high producing dairy cows*'.
15. Chaveiro, A.; Andrade, M.; Borba, A.E.S.; J. F. Moreira da Silva (2011). "*Association between Plasma and Milk Urea on the Insemination Day and Pregnancy Rate in Early Lactation Dairy Cows*", «Journal of Physiology and Pharmacology Advances», 1(4): 9-14. ISSN 2251-7693.
16. Colazo, M.G., Mapletoft, R.J. (2014) '*A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle*', Canadian Veterinary Journal, 55(8), 772-780.
17. Colleau, J.J. (2004) '*Utilité des biotechnologies de la reproduction pour la sélection des bovins laitiers*', HAL (le Centre Pour la Communication Scientifique Directe) <https://hal.inrae.fr/hal-02760408>.
18. Da Silva, E.I.C. (2022) *Fisiologia da reprodução de bovinos leiteiros: aspectos básicos e clínicos*. Emanuel Isaque Cordeiro da Silva.
19. De Rensis, F. et Scaramuzzi, R.J. (2003) '*Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review*', Theriogenology, 60(6), p. 1139-1151. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00126-2).
20. Descoteaux, L. (2012) *Vade-mecum de gestion de la reproduction des bovins laitiers*. Méd'com, 240 p.
21. De Vries, A., & Marcondes, M.I. (2020) '*Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows*', Animal, 14(S1), s155-s164.
22. Diah Tri Widayati et al. (2019) '*Cortisol and blood urea nitrogen profiles in fertile and repeat-breeder Holstein-Friesian crossbred cows*', Pakistan Journal of Biological Sciences, 22, 356-360.
23. Dickinson, S.E., Elmore, M.F., Kriese-Anderson, L., et al. (2019) '*Evaluation of age, weaning weight, body condition score, and reproductive tract score in pre-selected beef heifers relative to reproductive potential*', Journal of Animal Science and Biotechnology, 10, 18. DOI: 10.1186/s40104-019-0329-6. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0329-6>
24. Diskin, M.G. (2018) '*Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle*,' Animal, 12, pp. s75–s84. <https://doi.org/10.1017/s1751731118000952>.
25. Diskin, M.G. & Morris, D.G. (2008) '*Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants*', Reproduction in Domestic Animals, 43, 260–267. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.

26. Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y., & Koyama, H. (2008) *'The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle'*, Theriogenology, 69, 124–128. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.001.
27. Drillich, M. and Wagener, K.B. (2018) *'Pathogenesis of uterine diseases in dairy cattle and implications for fertility'* Animal Reproduction, 15(Suppl. 1), pp. 879–885. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2018-0023>.
28. Dufour, J. (2019, 24 septembre) *'Transfert d'embryons Bovins - Centre hospitalier universitaire vétérinaire'*, Centre hospitalier universitaire vétérinaire. <https://chuv.umontreal.ca/le-chuv/clinique-ambulatoire/service-de-theriogenologie-bovin/transfert-dembrions-bovins/>
29. Etim, N.A.N., Offiong, E.E.A., Udo, M.A.D., Williams, M.E., & Evans, E.I. (2013) *'Physiological relationship between stress and reproductive efficiency'*, Agricultural and Biological Journal of North America, 4, 600-604.
30. Ferreira, J.E., Mello, M.R.B. de, Alves, P.A. de P.M., Mello, R.R.C. and Palhano, H.B. (2014). *Effect of follicular wave synchronization on superovulatory response of Girolando embryo donors*. Revista Brasileira de Zootecnia, 43(11), pp.568–572. doi:<https://doi.org/10.1590/s1516-35982014001100002>.
31. Ferreira, R.M., Ayres, H., Chiaratti, M.R., Ferraz, M.L., Araújo, A.B., Rodrigues, C.A., ... Lauria, A. (2011) *'The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts'*, Journal of Dairy Science, 94, 2383–2392
32. Fesseha, H., & Degu, T. (2020). *"Estrus detection, Estrus synchronization in cattle and it's economic importance."* International Journal of Veterinary Research, 3(1), 1001.
33. Garrido, M.R., Peña, A.I., Herradon, P.G., Becerra, J.J., Sande, J., & Quintela, L.A. (2020) *'Evaluation of tubal patency in repeat breeder Holstein cows'*, Spanish Journal of Agricultural Research, 17, e04SC02.
34. Gebremedhin, D. (2008) *'Assessment of Problems/Constraints Associated with Artificial Insemination Service in Ethiopia'*, MSc thesis, Addis Ababa University, DebreZeit, Ethiopia.
35. Gulliver, C. et al. (2012) *'The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle'*, Animal Reproduction Science, 131(1-2), p.9-22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.002>.
36. Gunaretnam, I., Pretheeban, T., & Rajamahendran, R. (2013) *'Effects of ammonia and urea in vitro on mRNA of candidate bovine endometrial genes'*, Journal of Animal Reproduction Science, 141, 42-51.

37. Guzel, S., & Tanriverdi, M. (2014) '*Comparison of serum leptin, glucose, total cholesterol and total protein levels in fertile and repeat breeder cows*', Revista Brasileira de Zootecnia, 43, 643–647.
38. Hagen et Nouvel (2020) *Pathologie de la reproduction*, physiologie.envt.fr.
<https://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2020/09/prope-semiose2020.pdf>.
39. Hanzen, C.H.(2016) *La rétention placentaire chez les ruminants*, Faculté de Médecine Vétérinaire Service de Thériogenologie des animaux de production.
<http://www.therioruminant.ulg.ac.be/index.html>.
https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/70549/1/R11_Retention_placentaire_2016.pdf.
40. Hanzen, C.H., Drion, P.V., Lourtie, O., Depierreux, C., & Christians, E. (1999) '*La mortalité embryonnaire : Aspects cliniques et facteurs étiologiques dans l'espèce bovine*', Annales de Médecine Vétérinaire, 143, 91-118.
41. Hasler, J.F. and Barfield, J.P. (2021) '*In vitro fertilization*,' Bovine Reproduction, pp. 1124–1141. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch89>.
42. Hassaneen, A. S. A., Rawy, M. S., Yamanokuchi, E., Elgendy, O., Kawano, T., Wakitani, S., Kitahara, G., & Osawa, T. (2023) '*Use of platelet lysate for in-vitro embryo production and treatment of repeat breeding in cows*', Theriogenology, 210, 199-206. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.07.034. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.034>
43. Hosseini, L. et al. (2017) '*Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage*', Reproductive Biomedicine
44. Husnurrizal, H. et al. (2021) '*Analysis of progesterone hormone profile for diagnosis of early embryonic death in Aceh cattle*', AIP Conference Proceedings <https://doi.org/10.1063/5.0052562>.
45. Iftikhar, A.A., Usmani, R.H., Tunio, M.T. and Abro, S.H. (2009) '*Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRH analogue therapy*', Pakistan Veterinary Journal, 29, 93-94.
46. Jaureguiberry, M., Madoz, L.V. and De La Sota, R.L. (2015) '*Actualización en el síndrome de vaca repetidora*,' Taurus [Preprint]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/120350>.
47. Jaureguiberry, M., Giuliadori, M.J., Mang, A.V., Madoz, L.V., Pothmann, H., Drillich, M., & de la Sota, R.L. (2017) '*Repeat breeder cows with fluid in the uterine lumen had poorer fertility*', Journal of Dairy Science, 100, 3083–3085.
48. Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2004) '*Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows*', Theriogenology, 62, 103–112.
49. Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2006) '*Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows*', Animal Reproduction Science, 95, 54–66.

50. Kawano, K. et al. (2022) '*Effects of heat stress on the endometrial epidermal growth factor profile and fertility in dairy cows*', *Journal Of Reproduction And Development*, 68(2), p. 144-151. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-120>.
51. Khosa, B.K. (2020) '*Repeat Breeding : A Dent to Dairy Farm Economy*', *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, 9(7), p. 4085-4091. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.907.480>.
52. Kowalczyk, A., Czerniawska-Piątkowska, E., & Wrzecińska, M. (2021) '*The importance of Interferon-TAu in the diagnosis of pregnancy*', *BioMed Research International*, 2021, 1-6. DOI: 10.1155/2021/9915814. <https://doi.org/10.1155/2021/9915814>
53. Lacetera, N., Scalia, D., Franci, O., Bernabucci, U., Ronchi, B., & Nardone, A. (2004) '*Effects of non-esterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers*', *Journal of Dairy Science*, 87, 1012–1014.
54. Lafi, S.Q., Kaneene, J.B., Black, J.R., & Lloyd, J.W. (1992) '*Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. II. Economic modeling*', *Preventive Veterinary Medicine*. DOI: 10.1016/0167-5877(92)90088-W. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90088-W](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90088-W)
55. LeBlanc, S.J., Herdt, T.H., Seymour, W.M., Duffield, T.F., & Leslie, K.E. (2004) '*Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease*', *Journal of Dairy Science*, 87, 609–619.
56. López-Gatius, F., & Garcia-Ispuerto, I. (2020) '*Treatment with an elevated dose of the GnRH analogue dephereline in the early luteal phase improves pregnancy rates in repeat-breeder dairy cows*', *Theriogenology*, 155, 12-16.
57. Lucassen, P.J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O.F., & van Dam, A.M. et al. (2014) '*Neuropathology of stress*', *Acta Neuropathologica*, 127, 109-135.
58. Magnier, F. (2020) '*Les facteurs de stress et leur impact sur la reproduction des animaux*', <https://www.xr-repro.fr/le-mag/les-facteurs-de-stress-et-leur-impact-sur-la-reproduction-des-animaux>
59. Mahnani, A., Sadeghi-Sefidmazgi, A., & Cabrera, V.E. (2015) '*Consequences and economics of metritis in Iranian Holstein dairy farms*', *Journal of Dairy Science*, 98, 6048-6057.
60. Mann, G.E., Mann, S.J., Blache, D., & Webb, R. (2005) '*Metabolic variables and plasma leptin concentrations in dairy cows exhibiting reproductive cycle abnormalities identified through milk progesterone monitoring during the postpartum period*', *Animal Reproduction Science*, 88, 191–202.

61. Marini, M.G. et al. (2016) '*Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro*', Reproductive Biology and Endocrinology, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0195-4>.
62. Markos, A., Aloto, D. et Geinoro, T. (2019) '*International Journal of Animal Science Gr up SM OPEN ACCESS Common Reproductive Disorders and Associated Impacts on Reproductive Performance in Dairy Cows in Ethiopia* ', ResearchGate .
https://www.researchgate.net/publication/373076442_International_Journal_of_Animal_Science_Gr_up_SM_OPEN_ACCESS_Common_Reproductive_Disorders_and_Associated_Impacts_on_Reproductive_Performance_in_Dairy_Cows_in_Ethiopia.
63. Martins, T. M.; Borges, A. M. (2011) '*Avaliação uterina em vacas durante o puerpério*'. Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 433-443.
64. Moraes, J.G.N. et al. (2021) '*Risk factors for purulent vaginal discharge and its association with reproductive performance of lactating Jersey cows*', Journal of Dairy Science, 104(12), pp. 12816–12829. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20502>.
65. Moreno, C. G., Luque, A. T., Galvão, K. N., & Otero, M. C. (2022) '*Bacterial communities from vagina of dairy healthy heifers and cows with impaired reproductive performance*', Research in Veterinary Science, 142, 15–23. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.11.007.. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.11.007>
66. Nowicki, A. (2021) '*Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows*', Journal of Veterinary Research, 65(2), 231–237. DOI: 10.2478/jvetres-2021-0018.. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0018>
67. O'Connor, L.M. (2003) '*Reviewing Artificial Insemination Technique*', The Pennsylvania State University, Agricultural Research and Cooperative Extension. Review Article, Pp. 1–6.
68. Odle, A.K., Akhter, N., Syed, M.M., Allensworth-James, M.L., Beneš, H., Melgar Castillo, A.I., MacNicol, M.C., MacNicol, A.M., & Childs, G.V. (2018) '*Leptin regulation of gonadotrope gonadotropin-releasing hormone receptors as a metabolic checkpoint and gateway to reproductive competence*', Frontiers in Endocrinology, 8, 367.
69. Pérez-Marín, C.C., & España, F. (2007) '*Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay*', Reproduction in Domestic Animals, 42, 449–456.
70. Pérez-Marín, C.C., Moreno, L.M., & Calero, G.V. (2012) '*A bird's-eye view of veterinary medicine*'. InTech; Rijeka, Clinical approach to the repeat breeder cow syndrome; pp. 337–362
71. Pérez-Marín, C.C. and Quintela L.A. (2023) '*Current insights in the repeat breeder cow syndrome*', Animals, 13(13), p. 2187. <https://doi.org/10.3390/ani13132187>.

72. Peters, S.O., Kizilkaya, K., Garrick, D.J., Fernando, R.L., Reecy, J.M., Weaver, R.L., et al. (2013) '*Heritability and Bayesian genome-wide association study of first service conception and pregnancy in Brangus heifers*', Journal of Animal Science, 2013(91), 605–12.
73. Pinto, C.R. (2022) *Embryo Transfer in Cattle*. <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/embryo-transfer-in-farm-animals/embryo-transfer-in-cattle>.
74. Ponsart, C., Guyader-Joly, C., Freret, S., Gerard, O., & Humblot, P. (2007) '*Embryons in vitro: évolution et perspectives*', Point Vet., 2007. N° 273, 43–45.
75. Prasad, S., Tiwari, M., Pandey, A.N., Shrivastav, T.G., & Chaube, S.K. (2016) '*Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome*', Journal of Biomedical Science, 23, 36–40.
76. Reddy, P.D.P. et al. (2023) '*Nutritional strategies for amelioration of heat stress in dairy cows : A Review*', International Journal Of Veterinary Sciences And Animal Husbandry, 8(3S), p. 33-39. <https://doi.org/10.22271/veterinary.2023.v8.i3sa.613>.
77. Robertson, I., and R. E. Nelson. (2009). *Certification and Identification of the Embryo: Manual of the International Embryo Transfer Society*. IETS, Savoy, IL.
78. Robinson, R.S., et al. (2006) '*In vivo expression of interferon-tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon-tau during early pregnancy in the cow*', Molecular Reproduction and Development, 73, 470–474.
79. Rodrigues, C.A., Ayres, H., Ferreira, R.M., Teixeira, A.A., Mancilha, R.F., Oliveira, M.E.F., Souza, A.H., & Baruselli, P.S. (2007) '*Comparison of pregnancy rates after artificial insemination or embryo transfer in high producing repeat breeder Holstein cows*', Acta Scientiae Veterinariae, 35(Suppl. 3), 1255.
80. Rodriguez Jimenez, C. et al. (2013) '*BIOTECNICAS REPRODUTIVAS NA FEMEA BOVINA*', ReseachGate https://www.researchgate.net/publication/266141405_BIOTECNICAS_REPRODUTIVAS_NA_FEMEA_BOVINA.
81. Salasel, B., Mokhtari, A., & Taktaz, T. (2010) '*Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows*', Theriogenology, 74, 1271–1278.
82. Santos, J.E.P., Rutigliano, H.M., & Sá Filho, M.F. (2009) '*Risk factors for resumption of postpartum cyclicity and embryonic survival in lactating dairy cows*', Animal Reproduction Science, 110, 207–221.
83. Sartori, R., Bastos, M.R., & Wiltbank, M.C. (2010) '*Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle*', Reproduction, Fertility, and Development, 22, 151–158. doi: 10.1071/RD09221.

84. Selk, G. (2004) '*Artificial insemination for beef cattle*', Oklahoma Cooperative Extension Service, oksa_ANSI-3164_2004-06.pdf (shareok.org)
85. Setiadi, A., Widyobroto, B.P., & Rustamaji, D.B. (2003) '*Blood plasma glucose and blood plasma urea concentration on Friesian Holstein crossbred cows were given by diets of rumen's undegradable protein level*', Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture, 28(4), 211–7.
86. Sharma, A. (2015) '*An assignment on repeat breeding condition in cattle*', www.academia.edu https://www.academia.edu/11821923/An_assignment_on_repeat_breeding_condition_in_cattle?email_work_card=view-paper.
87. Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., & Gilbert, R.O. (2006) '*Defining postpartum uterine disease in cattle*', Theriogenology, 65, 1516–1530. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.08.021.
88. Shrestha, H.K., Nakao, T., Higaki, T., Suzuki, T., & Akita, M. (2004) '*Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows*', Theriogenology, 61(4), 637-49.
89. Silvestre, F.T. et al. (2011) '*Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows : i. uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation*', Journal of Dairy Science, 94(1), p. 189-204. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3370>.
90. Sinedino, L.D.P., Honda, P.M., Souza, L.R., Lock, A., Boland, M., Staples, C., Thatcher, W., & Santos, J. (2017) '*Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows*', Reproduction, 153(5), 707–723. doi: 10.1530/rep-16-0642.. <https://doi.org/10.1530/rep-16-0642>
91. Singh, B., Saravia, F., Bage, R., & Rodriguez-Martinez, H. (2005) '*Pregnancy rates in repeat-breeder heifers following multiple artificial inseminations during spontaneous oestrus*', Acta Veterinaria Scandinavica, 46, 1–12.
92. Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., & Bazer, F.W. (2004) '*Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy*', Animal Reproduction Science, 82-83, 537–50.
93. Sood, P., Zachut, M., Dube, H., & Moallem, U. (2015) '*Behavioral and hormonal pattern of repeat breeder cows around estrus*', Reproduction, 149, 545–554.
94. Sood, P., Zachut, M., Dekel, I., Dube, H., Jacoby, S., & Moallem, U. (2017) '*Preovulatory follicle characteristics and oocyte competence in repeat breeder dairy cows*', Journal of Dairy Science, 100, 9372–9381.
95. Souza, A.H., Narciso, C.D., Batista, E.O.S., Carvalho, P.D., & Wiltbank, M.C. (2014) '*Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows*', Animal Reproduction, 11, 159–167.

96. Teeli, A.S., Sheikh, P.A., Patra, M.K., Singh, D., Kumar, B., Kumar, H., Singh, S.K., Verma, M.R., & Krishnaswamy, N. (2019) '*Effect of dietary n-3 polyunsaturated rich fish oil supplementation on ovarian function and interferon stimulated genes in the repeat breeding cow*', *Animal Reproduction Science*, 211, 106230.
97. Walsh, S.W., Williams, E.J., & Evans, A.C. (2011) '*A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows*', *Animal Reproduction Science*, 123, 127–138.
98. Wankhede, P. (2018) '*Heat Stress in Dairy Cows-Its Impact and Management : A Short Notes*', www.academia.edu.
https://www.academia.edu/98587025/Heat_Stress_in_Dairy_Cows_Its_Impact_and_Management_A_Short_Notes?email_work_card=view-paper.
99. Wathes, D.C., Taylor, V.J., Cheng, Z., Swali, A., & Beever, D.E. (2004) '*Relations between energy balance and reproduction in high-yielding dairy cows*'.
100. Weiner, D., Mitch, W.E., & Sands, J.M. (2015) '*Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion*', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 1444-1458.
101. Whirledge, S., & Cidlowski, J.A. (2010) '*Glucocorticoids, stress and fertility*', *Minerva Endocrinologica*, 35, 109-125.
102. Yaginuma, H., Funeshima, N., Tanikawa, N., Miyamura, M., Tsuchiya, H., Noguchi, T., & Hamano, S. (2019) '*Improvement of fertility in repeat breeder dairy cattle by embryo transfer following artificial insemination: possibility of interferon tau replenishment effect*', *Journal of Reproduction and Development*, 65, 223-229. doi: 10.1262/jrd.2018-121.
103. Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R.B., Gautam, G., Long, S.T., Yoshida, C., Koike, K., & Hayashi, A. (2010) '*Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds*', *Theriogenology*, 73, 1220–1229.
104. Zhu, Y., Yuan, M., Meng, H.Y., Wang, A.Y., Guo, Q.Y., Wang, Y., & Peng, J. (2013). '*Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review*'. *Osteoarthritis Cartilage*.