

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Simone Stefanello

**METABOLISMO HEPÁTICO E SUA INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO
REPRODUTIVO EM BOVINOS**

Santa Maria, RS
2020

Simone Stefanello

**METABOLISMO HEPÁTICO E SUA INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO
REPRODUTIVO EM BOVINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária.**

Orientador: Alfredo Quites Antoniazzi

Santa Maria, RS
2020

Stefanello, Simone
Metabolismo hepático e sua influência no desempenho
reprodutivo em bovinos / Simone Stefanello.- 2020.
71 p.; 30 cm

Orientador: Alfredo Quites Antoniazzi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Colesterol 2. Fígado 3. ISG15 4. Progesterona 5.
Senécio I. Quites Antoniazzi, Alfredo II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a Simone Stefanello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 999335271 – E-mail: simonestefanello@yahoo.com.br

Simone Stefanello

**METABOLISMO HEPÁTICO E SUA INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO
REPRODUTIVO EM BOVINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2020:

Alfredo Quites Antoniazzi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcos Henrique Barreta, Dr. (UFSC)

Fernando Silveira Mesquita, PhD. (UNIPAMPA)

Mauren Picada Emanuelli, Dra. (UNIPAMPA)

Adriano Tony Ramos, Dr. (UFSC)

Santa Maria, RS
2020

Aos meus pais, pela educação e amor incondicional e pelo suporte em todas as fases da vida, dedico!

AGRADECIMENTOS

À minha família, Pai e Mãe, pela vida, pela educação, por me construírem em valores e princípios, me regarem com amor e serem incentivadores do meu estudo. À minha grande família, Padrinho, Madrinha, Piquena, Dé, Maria Clara, Mana, Fabinho, Natalia, Nêne, Graci, Amábile e Amadeu, minha família de criação, obrigada pelo suporte, pelo amor e por tudo que compartilhamos. À minha querida avó Disselda, que não presenciará essa conquista, dedico!

Aos meus amigos, que pelo grande número inviabiliza colocar os nomes, pelo entendimento de eu não estar presente em inúmeros momentos que sei que não viverei mais, por entenderem a ausência e a distância, por serem amigos, companheiros, fiéis fontes de força e luta. Gratidão.

Ao meu orientador, Alfredo Quites Antoniazzi, pelo exemplo e por representar o que eu projeto ser no futuro, que além de ser um professor e orientador excelente, é um bom amigo e um ser humano capaz de se colocar no lugar do outro, sempre disposto a dar força e bons conselhos para todos que o rodeiam.

Aos professores que participaram da minha orientação, Valério e Gilberto, muito obrigada!

Á UDELAR e ao INIA La Estanzuela, em especial aos professores responsáveis, e a Alsiane Capelesso, que realizou as coletas das amostras a campo utilizadas no primeiro manuscrito, obrigada por ceder amostras para avaliação das mesmas sob uma perspectiva reprodutiva e por possibilitar essa colaboração entre as instituições. Ao professor Gilberto (LABRUMEN) por intermediar e estreitar essas colaborações e abrilhantar com ideias inovadoras as pesquisas realizadas.

Á todos os colegas do BioRep por toda amizade e pelo apoio nestes anos. Em especial à minha querida colega Carolina dos Santos Amaral pelo companheirismo e pela paciência de me ensinar e me acompanhar na realização das mais apuradas técnicas. Agradeço também a Mari, a Kalyne, o Fabrício, o Igor e o Bruno pela parceria na realização das atividades de campo.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS e UFSM pelo apoio financeiro e pela oportunidade da realização de uma formação de qualidade. Ao PPGMV pela oportunidade e pelo apoio administrativo.

Ao Exército Brasileiro, em especial ao Campo de Instrução Barão de São Borja, na figura do TC Paulo Norberto, diretor da unidade, por permitir a coleta de amostras nas vacas e

a realização do experimento. Ao TC Paulo Norberto, por entender a importância da qualificação profissional e da inovação tecnológica, por ter possibilitado terminar essa etapa de grande importância em minha carreira profissional, por todo o suporte e amizade, meu muito obrigado e meu respeito.

A todos os integrantes do CIBSB, do efetivo profissional e variável e em especial à minha equipe, os “Campeiros do Saycan” que me representam, me dão orgulho, aceitam crescer, aproveitam as oportunidades, são fiéis e trabalhadores, meu Muito Obrigado! A todos os amigos que serviram comigo nesta unidade desde 2017, em especial: Jonas, Arend, Juliana C., Pelegrino, Correia, Ribeiro, Santana e agora na árdua reta final Marcelo, Bruna, Josi, Juliana F. e Renata pelas palavras de conforto e pela mão amiga. Ao incentivo do Cel Ronaldo para que essa etapa fosse concluída. Gratidão.

À Deus, pela vida e pela força! Às minhas N. S. de Fátima e Aparecida e ao S. Francisco, por me escutarem em todos os momentos de aflição, os quais eu imaginava que esse dia não seria possível! À fé, à resiliência e à antifrágilidade, gratidão!

RESUMO

METABOLISMO HEPÁTICO E SUA INFLUÊNCIA NO DESEMPENHO REPRODUTIVO EM BOVINOS

AUTOR: Simone Stefanello

ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

A eficiência reprodutiva é o parâmetro que mais afeta a produtividade e a lucratividade dos sistemas de produção de bovinos de corte e de leite, e a maioria das perdas gestacionais ocorre precocemente, no primeiro trimestre da gestação. Nessa tese buscou-se avaliar parâmetros do metabolismo nutricional e hepático e a influência de comprometimento hepático na taxa de concepção em bovinos. No primeiro estudo foi relacionado a condição nutricional e as variáveis metabólicas e sua relação com os índices reprodutivos, observando que as variáveis metabólicas influenciam o desempenho reprodutivo desde o período de transição e que maiores concentrações de ureia sanguínea estão relacionadas a animais com maior número de inseminações e maior intervalo entre parto e concepção (100-150 dias e mais de 150 dias de intervalo). Além disso, o retorno precoce a ciclicidade não garante um menor intervalo entre parto e concepção. No segundo estudo, o objetivo foi avaliar os parâmetros hepáticos e sua influência no reconhecimento materno da gestação em bovinos de corte com ingestão natural de *Senecio spp.* As vacas foram divididas em dois grupos: o grupo 1 apresentando GGT menor que 30 U/L e o grupo 2 apresentando GGT acima de 31 U/L. Para avaliar a saúde hepática, foi utilizada a concentração sanguínea de GGT aliada à exames citológicos e histopatológicos que identificaram megalocitose, células binucleadas e outros achados sugestivos de seneciose. A taxa de prenhez, o diâmetro do CL e a concentração de progesterona foram maiores nas vacas do grupo 1. Também, foi observado que não houve diferença nos escores de condição corporal entre os grupos. Algumas vacas apresentaram um CL grande na avaliação ultrassonográfica, alta concentração de progesterona e alta expressão de mRNA de *ISG15* no Dia 19, e foram diagnosticadas vazias no dia 45, o que sugere a ocorrência de perda embrionária após o Dia 19, permitindo a identificação de outras causas de mortalidade embrionária relacionadas a insuficiência do corpo lúteo. Em conclusão, apesar dos diferentes níveis de lesão hepática não alterarem a percepção da condição corporal, comprometeram a disponibilidade de progesterona necessária para a sobrevivência embrionária, prejudicando o reconhecimento materno da gestação. Dessa forma, a funcionalidade hepática é determinante da eficiência reprodutiva, que traduz a condição nutricional e metabólica do animal.

Palavras-chave: colesterol, fígado, interferon, ISG15, progesterona.

ABSTRACT

HEPATIC METABOLISM AND ITS INFLUENCE ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN CATTLE

AUTHOR: Simone Stefanello
ADVISER: Alfredo Quites Antoniazzi

Reproductive efficiency is the parameter that most affects the productivity and profitability of beef and dairy cattle production systems, and most gestational losses occur early during the first trimester of gestation. In the first experiment it was related to the nutritional condition, the metabolic and productive variables and their relation with the reproductive indices and it was observed that the metabolic variables influence on the reproductive performance since the transition period and that higher blood urea concentrations are related to animals with higher number of artificial inseminations and longer interval between calving and a new conception (mid-c group – 100 to 150 days and late-c group >150 days). In addition, early return to cyclicity does not assure a shorter interval between calving and a new conception, and the progesterone synthesis is directly related to cholesterol availability. The second experiment aimed to evaluate liver parameters and the influence on maternal recognition of pregnancy in beef cattle presenting natural ingestion of *Senecio* spp. The cows were divided in two groups: group 1 presenting GGT lower than 30 and group 2 GGT above 31 U/L. To evaluate liver health was used GGT status, cytological and histopathological exams that presented megalocytosis and binucleated cells and other findings suggestive of Seneciosis. The pregnancy rate was higher, CL diameter greater and concentration of progesterone on the cows from the group 1. However, no difference on body condition scores. Some cows presented a large CL on US scanning, high concentration of progesterone, and high ISG15 mRNA expression on Day 19, and it is an open cow on Day 45, that suggests us this cow had embryo loss beyond D19, indicating that cows are in the process of embryonic mortality and may allow a better identification of causes that may be related to corpus luteum insufficiency, and to be associated to a possible embryonic loss. In conclusion, although the different levels of liver damage do not alter the perception of body condition, they compromised the availability of progesterone necessary for embryonic survival and have the potential to impair maternal recognition of pregnancy. Thus, liver function determine the reproductive efficiency, and reflects the nutritional and metabolic condition of the animal.

Keywords: cholesterol, liver, interferon, *ISG15*, progesterone.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO I

Figure 1 - Body condition score (A), energy balance (B), serum N-urea (C) and Milk production (D) of Holstein heifers allocated into one of three distinct groups according to calving to conception intervals: early-conception group (early-c; <100 days), mid-conception group (mid-c; 100 – 150 days), and late-conception group (late-c; >150 days). Data presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ ($n=20$).....39

Figure 2 - HDL (A), LDL (B), total (C) cholesterol and serum progesterone (D) concentration of Holstein heifers allocated into one of three distinct groups according to calving to conception intervals: early-conception group (early-c; <100 days), mid-conception group (mid-c; 100 – 150 days), and late-conception group (late-c; >150 days). Data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ ($n=20$).....40

MANUSCRITO II

Figure 1- (A) Serum concentration of GGT (U/L). Histological section of the liver showing megalocytosis (red arrow) and binucleated cells (black arrow) (B and C), fibrosis and proliferative biliary ducts (D) suggestive of seneciosis.....60

Figure 2- Corpus luteum diameter (A), pregnancy rate (B) and serum concentration of progesterone (C) of cows presenting low (<30) and high (>30) level of GGT. * represents difference $P < 0.05$61

Figure 3- ISG15mRNA expression in non-pregnant and pregnant cows presenting low (<30) and high (>30) level of GGT.....62

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO II

Table 1. Primers designed for quantitative real-time PCR analysis.....	58
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	122
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	155
2.1	SUCESSO REPRODUTIVO: DA TRANSIÇÃO ATÉ O PARTO.....	155
2.2	INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS DO METABOLISMO HEPÁTICO E NUTRICIONAIS NO DESEMPENHO REPRODUTIVO.....	166
2.3	COMPROMETIMENTO HEPÁTICO E REPRODUTIVO RELACIONADO AO CONSUMO DE PLANTAS DO GÊNERO SENECIO.....	188
2.3.1	<i>Senecio spp.</i> no Rio Grande do Sul	200
2.4	RECONHECIMENTO MATERNO E MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO	211
2.4.1	Síntese de Progesterona.....	222
3	CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – NITROGENOUS METABOLIC COMPONENTS AND NEGATIVE ENERGETIC BALANCE ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN DAIRY CATTLE.....	244
4	CAPÍTULO II – MANUSCRITO II – IMPACT OF SENECIOSIS IN EARLY EMBRYO DEVELOPMENT AND MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN BEEF CATLLE.....	411
5	DISCUSSÃO.....	633
6	CONCLUSÕES.....	655
	REFERÊNCIAS	666

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção, tanto de bovinos de corte quanto para a produção de leite, o desempenho reprodutivo é fator determinante para a obtenção da eficiência e da lucratividade no sistema, sendo preponderante a condição nutricional e metabólica, além de outros fatores. Assim sendo, o suprimento das exigências nutricionais e minerais dos bovinos define o controle fisiológico e, conseqüentemente, eficiência reprodutiva. Nesse sentido o fígado, órgão central de inúmeras competências, tem função ímpar na distribuição e metabolização dos nutrientes sendo, por esse motivo, também determinante da eficiência reprodutiva.

Animais de alta produção, de carne ou de leite, apresentam uma grande demanda nutricional, de energia e proteína, que quando não acompanhada do aumento compensatório do fornecimento desses nutrientes, culmina em uma função reprodutiva prejudicada (MAGGIONI; ROTTA; ITO; MARQUES *et al.*, 2008). Assim, ao entrar em balanço energético negativo, as vacas apresentam interferência na capacidade do eixo hipotálamo-hipofisário em desenvolver os pulsos de LH necessários para promover o desenvolvimento folicular e a conseqüente ovulação. Além disso, o déficit de energia também leva a baixas concentrações de insulina durante este período, o que pode limitar a capacidade de resposta do ovário para a estimulação das gonadotropinas (BUTLER; SMITH, 1989).

Para que o estabelecimento de uma nova gestação aconteça, é necessário ocorrer o retorno a ciclicidade, ovulação, fertilização e adesão uterina por um embrião viável (MORAES; MAIA; ALVARENGA; OBA, 2014). Uma vez formado, o desenvolvimento do concepto equivale a melhor sinalização e inibição eficaz da luteólise. Para isso, concentrações satisfatórias de progesterona no período crítico de reconhecimento materno possibilitam um ambiente uterino devidamente preparado, com condições mais favoráveis para o desenvolvimento embrionário, o que irá favorecer o estabelecimento da gestação (MACHADO; BARBOSA; SILVA; BERGAMASCHI *et al.*, 2006).

A progesterona participa da regulação do ciclo reprodutivo da fêmea (WILT BANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014). A produção de progesterona ocorre através das células luteais pequenas a partir das lipoproteínas após a estimulação por LH e grandes de forma constitutiva (BOGAN; NISWENDER, 2007). A esteroidogênese pode ser limitada principalmente pela disponibilidade das lipoproteínas precursoras. A concentração de progesterona circulante é determinada por um equilíbrio entre sua produção e metabolismo hepático (WILT BANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014).

Para tanto, o fígado constitui-se em um órgão central que reúne os nutrientes absorvidos e os metabólitos procedentes da circulação geral, moderando-os e distribuindo-os para os tecidos periféricos (KOZLOSKI, 2011). Assim sendo, apesar de uma nutrição satisfatória, sem saúde hepática, não haverá a distribuição de nutrientes para todos os sistemas do organismo, o que indiretamente compromete a eficiência reprodutiva.

Danos irreversíveis ao tecido hepático ocorrem por consequência da ingestão de alcaloides pirrolizidínicos (AP), que são fitotoxinas naturais que compõem as plantas do gênero *Senecio* (ELIAS; LATORRE; PÍPOLE; HARAGUCHI *et al.*, 2011). Como consequência da toxicidade de sua ingestão ocorre uma função hepática prejudicada (CHEEKE, 1988), o que promove um efeito indireto no desempenho reprodutivo. Assim sendo, as principais consequências sistêmicas da alteração no metabolismo hepático são nas concentrações de colesterol, ureia e esteroides sexuais.

A produção de progesterona necessária para a manutenção da gestação, desde o desenvolvimento embrionário inicial, implantação e placentação requer um corpo lúteo funcional (BAZER; SPENCER; OTT, 1997). E é através do interferon tau, que o embrião comunica sua presença à mãe a fim de que ela forneça secreção de progesterona lútea necessária para o estabelecimento da gestação (FARIN; IMAKAWA; M ROBERTS, 1989). Assim, a sinalização do concepto para o sistema materno tem ação luteotrófica, isto é, manutenção da função luteal, e antiluteolítica, impedindo a liberação uterina de prostaglandina luteolítica F2a (PGF) (BAZER; SPENCER; JOHNSON; BURGHARDT *et al.*, 2009)

A disponibilidade de progesterona circulante é determinada pelo balanço entre a produção luteal a partir do colesterol e seu metabolismo hepático (WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014). A viabilidade da síntese de progesterona é determinada pelo fígado, órgão responsável pela síntese de albumina, fibrinogênio, globulinas, lipoproteínas e colesterol, além de inúmeras outras funções (GONZALEZ; SCHEFFER, 2003). Assim sendo, o fígado determina a disponibilidade de colesterol para a síntese de progesterona luteal, bem como sua metabolização, interferindo no reconhecimento materno da gestação.

O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros do metabolismo hepático e a influência de seu comprometimento na taxa de concepção em bovinos. Sabe-se que os aspectos nutricionais são de grande relevância na eficiência reprodutiva e como resultado da nutrição, o metabolismo hepático e a distribuição pelo sangue periférico afetam o desempenho reprodutivo do animal.

Foram delineados dois experimentos sendo o primeiro relacionando à condição nutricional (balanço energético e escore de condição corporal), variáveis metabólicas (ureia, colesterol total, LDL e HDL) e a produção de leite e sua relação com os índices reprodutivos (intervalo entre parto e concepção, retorno a ciclicidade e progesterona sanguínea). No segundo experimento, foi avaliada a influência do comprometimento hepático na reprodução; quanto o efeito tóxico do consumo de *Senecio spp.* compromete a eficiência reprodutiva durante o período de reconhecimento materno da gestação. Assim sendo, buscou-se quantificar os efeitos deletérios da lesão hepática na reprodução, tendo em vista a estreita ligação com síntese de colesterol e progesterona, a fim de verificar uma possível ligação com a expressão gênica relacionada ao reconhecimento materno da gestação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUCESSO REPRODUTIVO: DA TRANSIÇÃO ATÉ O PARTO

A reprodução é fundamental para o sucesso da produção, tanto na bovinocultura de leite, quanto na de corte. Baixos índices reprodutivos prejudicam a lucratividade ao comprometer o sistema de produção, atrasando o progresso genético e aumentando as despesas (BISINOTTO; SANTOS, 2011). O puerpério é o período que ocorre após o parto e corresponde ao período de retomada da função reprodutiva da fêmea (HORTA, 1995). Para o estabelecimento de uma nova gestação, é necessário que ocorra a involução uterina, acompanhadas do retorno à ciclicidade. Tais mecanismos devem culminar no crescimento de um folículo saudável com o desenvolvimento de um oócito competente, demonstração de cio, ovulação, fertilização e adesão uterina por um embrião viável (MORAES; MAIA; ALVARENGA; OBA, 2014).

No sistema de produção de leite, o período de transição é a fase de repouso entre dois períodos consecutivos de lactação, que vai de 3 semanas antes a 3 semanas após o parto, o qual é extremamente importante para a saúde, produção e rentabilidade do sistema leiteiro (DRACKLEY, 1999). Neste período, é comum que as vacas entrem em balanço energético negativo (NEB), causado pelo aumento súbito da demanda de energia atribuída ao crescimento fetal, remodelação do tecido mamário e produção de leite ao reduzir a ingestão de matéria seca e nutrientes (ESPOSITO; IRONS; WEBB; CHAPWANYA, 2014). O aumento da capacidade de produção de leite agrava o balanço energético negativo, que combinado a um manejo nutricional deficiente tem sido associado ao declínio da fertilidade, onde as demandas metabólicas de maior produção estão relacionadas à diminuição do desempenho reprodutivo (BUTLER, 2001).

A eficiência reprodutiva é o fator que, isoladamente, mais afeta a produtividade e a lucratividade de um rebanho, considerando que ocorrem perdas reprodutivas desde a concepção (natural ou artificial) até o parto. A maioria dessas perdas acontece durante os primeiros 35 dias de gestação, que corresponde ao período embrionário e pode atingir 40% dos conceptos (BERGAMASCHI; MACHADO; BARBOSA, 2010).

O aumento da compreensão do ciclo estral bovino levou ao desenvolvimento de programas reprodutivos que permitem sincronização precisa do desenvolvimento do folículo, regressão lútea e ovulação (BISINOTTO; SANTOS, 2011). A relevância do uso da

inseminação artificial é a capacidade de detectar o estro para o melhor tempo de reprodução o que promove maiores índices reprodutivos (BISINOTTO; SANTOS, 2011).

A mortalidade embrionária é considerada a principal causa do aumento no intervalo de partos nos bovinos, por fatores ambientais, genéticos, metabólicos, nutricionais e infecciosos (SARTORI; DODE; GENÉTICOS; BIOTECNOLOGIA, 2008). A perda embrionária é o principal fator que contribui para o fracasso reprodutivo de uma vaca. De acordo com (MORRIS; DISKIN, 2008) 70% a 80% das perdas embrionárias ocorrem nas primeiras duas semanas após a inseminação artificial.

Animais com lesão hepática apresentam a função reprodutiva comprometida, onde o padrão do desenvolvimento folicular e as características do fluido folicular são diferentes em vacas com saúde hepática quando comparadas as vacas com lesão hepática, comprometendo também a qualidade dos oócitos (IWATA; TANAKA; KANKE; SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Além disso, os alcalóides pirrolizidínicos tóxicos aos hepatócitos, comprometem também as células luteais do corpo lúteo (KRABBE; GONÇALVES; POZZOBON; PESSOA *et al.*, 2015) interferindo na síntese da progesterona necessária para a manutenção da gestação (WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014). Dessa forma, muitas são as causas de mortalidade embrionária, podendo estar interligadas a outros sistemas do organismo, que não o sistema reprodutivo.

Outra evidencia da interferência da nutrição na qualidade embrionária é apresentada por (RHOADS; RHOADS; GILBERT; TOOLE *et al.*, 2006) onde vacas com altas concentrações de ureia plasmática diminuíram a viabilidade embrionária através dos efeitos que ocasionaram no oócito ou no embrião antes do estabelecimento no útero até sete dias após a inseminação.

2.2 INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS DO METABOLISMO HEPÁTICO E NUTRICIONAIS NO DESEMPENHO REPRODUTIVO

Os tecidos gastrintestinais representam uma interface entre a dieta e o animal, tendo uma influência direta no fluxo de nutrientes do lúmen para a corrente sanguínea. O fígado, por sua vez, constitui-se no órgão central que reúne os nutrientes absorvidos e os metabólitos procedentes da circulação geral, moderando-os e distribuindo-os para os tecidos periféricos (KOZLOSKI, 2011).

As células do parênquima hepático ou hepatócitos são o tipo de células predominantes do fígado contabilizando 60% do número total e cerca de 80% do volume, sendo esse o maior

grupo, somados aos macrófagos ou células de Kupffer (8 a 12%), as células endoteliais delineando o Espaço de Disse (15 a 20%) e os adipócitos (JUNGERMANN; KEITZMANN, 1996).

O fígado mantém seu potencial mitótico durante toda a vida do organismo, entretanto, quando exposto cronicamente a alguma substância tóxica, acaba tendo sua função orgânica prejudicada, além de diminuição do tamanho e aumento de tecido conjuntivo fibroso intra-hepático. O fígado é responsável pela síntese de albumina, fibrinogênio, globulinas, lipoproteínas e colesterol, além de inúmeras outras funções (GONZALEZ; SCHEFFER, 2003).

A distribuição de nutrientes para diferentes funções fisiológicas tem diferentes prioridades. As funções de manutenção ou lactação precedem a função reprodutiva. Portanto, pequenos desequilíbrios nutricionais mostrarão suas consequências antes sobre a reprodução do que sobre outros sistemas. A causa mais frequente de falha reprodutiva na vaca leiteira é a mortalidade embrionária precoce (cerca de 30% do total das causas) e, na maioria dos casos, é associado a um erro nutricional (BACH; ESPAÑA, 2002).

A reprodução nos animais sofre influência de vários fatores, como espécie, raça, idade, escore de condição corporal (ECC) e nutrição. Dentre estes, a nutrição tem um papel reconhecidamente importante por afetar diretamente aspectos da fisiologia e desempenho reprodutivo na fêmea bovina (SARTORI; MOLLO, 2007). Maior ou menor balanço energético negativo (BEN) é dependente do nível de produção e da ingestão de energia e promove ou não problemas reprodutivos. O BEN ocorre, entre outras coisas, em momentos de pico de produção, por exemplo, de leite que se estabelece 4 a 6 semanas antes do pico de ingestão de matéria seca e a energia utilizada para manutenção e produção de leite, é maior do que a energia adquirida pela alimentação (SARTORI; MOLLO, 2007).

Mudanças metabólicas e hormonais durante o período de transição em bovinos de leite causam várias alterações fisiológicas, caracterizadas por uma maior mobilização de gordura e proteína. O uso de reservas corporais é necessário para atender às demandas de alta produção de leite (OSPINA; NYDAM; STOKOL; OVERTON, 2010).

A mobilização de reservas e a perda de escore de condição corporal estão fortemente associadas com o período pós-parto não-ovulatório, tanto em sistemas de leite, quanto de corte. A ovulação do folículo dominante de primeira onda está associada a níveis de ácidos graxos não esterificados, cetonas mais baixas no plasma e menor acumulação de triglicerídeos no fígado. O BEN e perda de condição corporal estão relacionados à redução da progesterona sérica e baixas taxas de prenhez (BUTLER, 2005).

O BEN na lactação inicial está intimamente relacionado ao retorno da atividade ovariana (DOSKA; SILVA; HORST; VALLOTO *et al.*, 2012). O BEN parece interferir principalmente na capacidade do eixo hipotálamo-hipofisário desenvolver os pulsos de LH necessários para promover o desenvolvimento folicular e consequente ovulação. Em segundo lugar, o déficit de energia leva a baixas concentrações de insulina durante este período, podendo limitar a capacidade de resposta do ovário para estimulação das gonadotropinas (BUTLER; SMITH, 1989).

O momento do retorno a ciclicidade após o parto em fêmeas bovinas é de fundamental importância para determinar quanto cedo essas vacas vão conceber e consequentemente, definir o intervalo de partos (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Outros fatores nutricionais podem interferir na reprodução, como o fornecimento de excessivas quantidades de proteína degradável na dieta, podendo levar a um aumento de ureia na circulação sanguínea e redução nas taxas de concepção (ELROD; VAN AMBURGH; BUTLER, 1993).

Toda amônia ruminal absorvida, oriunda de uma dieta contendo excessivas quantidades de proteína degradável no rúmen, ao atingir a corrente sanguínea e posteriormente o fígado, é captada e precisa ser metabolizada a ureia, o que consome intermediários do ciclo da ureia e energia (KOZLOSKI, 2011). Esse custo energético de síntese de ureia a partir de amônia representa um desvio de energia considerável (STEFANELLO; MEZZOMO; ZENI; EBLING *et al.*, 2018) que deixa de ser empregada nos outros sistemas do organismo.

Além disso, a utilização de altos teores de proteína ou nitrogênio não proteico na dieta promove elevadas concentrações plasmáticas de ureia e amônia, diminuindo o pH luminal uterino durante a fase lútea inicial e alterando a secreção das glândulas endometriais (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Dessa forma, o uso de uma fonte de proteína relativamente não degradável pode permitir o aumento de parâmetros produtivos, bem como o alívio dos efeitos deletérios sobre a fertilidade (ELROD; VAN AMBURGH; BUTLER, 1993).

2.3 COMPROMETIMENTO HEPÁTICO E REPRODUTIVO RELACIONADO AO CONSUMO DE PLANTAS DO GÊNERO SENÉCIO

O alcaloide pirrolizidínicos (AP) são fitotoxinas naturais (ELIAS; LATORRE; PÍPOLE; HARAGUCHI *et al.*, 2011) que compõem o gênero Senécio e causam danos

irreversíveis ao tecido hepático. A consequência de sua toxicidade é uma função hepática prejudicada (CHEEKE, 1988). As substâncias absorvidas pelo intestino têm seu primeiro contato no organismo com o fígado, que numa posição estratégica, impede a exposição do restante do organismo à ação de toxinas (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008). Os APs não são tóxicos, no entanto, quando transformados em metabólicos pirrólicos por enzimas hepáticas microssomais, se tornam moléculas tóxicas ativas (ELIAS; LATORRE; PÍPOLE; HARAGUCHI *et al.*, 2011). Ao serem produzidos no fígado, são importantes hepatotoxinas cumulativas, que se combinam com grupos pirróis, para formar tio ésteres pirrólicos. Esses são, então, convertidos em ésteres pirrólicos pelas enzimas hepáticas do citocromo P-450. Os ésteres são agentes alquilantes que reagem com ácidos nucleicos e com as proteínas nucleares e citosólicas, lesam as células hepáticas mediante inibição da mitose (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008).

Os citocromos P-450 são heme-proteínas envolvidas nas biotransformações de vários compostos de origem endógena e exógena, que biologicamente promovem a modificação química de várias moléculas exógenas lipofílicas, que após isso se tornam mais solúveis e de fácil excreção, porém uma consequência é que muitas moléculas, após sofrerem estas modificações (biotransformação), tornam-se muito reativas, podendo causar danos teciduais (LE MOS; TRINDADE, 2014). Dessa forma, os metabólicos pirrólicos passam a danificar proteínas, RNA e DNA, resultando em síntese proteica deficiente, perda de função celular, desenvolvimento de tumores e efeito anti-mitótico (ELIAS; LATORRE; PÍPOLE; HARAGUCHI *et al.*, 2011). Os hepatócitos não se dividem, mas continuam sintetizando DNA no núcleo e aumentando seu tamanho na tentativa de repor aqueles que sofreram necrose (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008).

Uma lesão celular tóxica dessa categoria ocorre mais frequentemente na área centrolobular do fígado, isso porque essa é a região com concentração mais alta de enzimas do citocromo P-450 (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008). Os danos hepáticos produzidos pelos APs são caracterizados por megalocitose das células parenquimatosas, proliferação de células de ductos biliares e fibrose em grau e distribuição variáveis (GRECCO; SCHILD; SOARES; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2010).

Ao realizar biópsia hepática em animais intoxicados por *Senécio spp.*, os principais achados histopatológicos nas biópsias hepáticas são fibrose hepática, megalocitose e proliferação de ductos biliares, onde em um estudo realizado o autor relata que as lesões hepáticas foram observadas em 73,4% dos bovinos submetidos à biópsia hepática (GIARETTA; PANZIERA; GALIZA; BRUM *et al.*, 2014).

Histologicamente, é possível observar a interrupção da arquitetura hepática, e lóbulos com abundante tecido conjuntivo e fibroblastos. Os hepatócitos remanescentes apresentam citoplasma vacuolado, formando nódulos rodeados por tecido conjuntivo. Outra lesão comumente encontrada são hepatócitos ampliados (megalocitose) em áreas periportais e marcada proliferação de ductos biliares (GIARETTA; PANZIERA; GALIZA; BRUM *et al.*, 2014). Além das alterações hepáticas, outras alterações extra-hepáticas já foram descritas em casos espontâneos de intoxicação por APs contidos em plantas do gênero *Senecio*, em que foram observadas alterações significativas em células luteínicas grandes (KRABBE; GONÇALVES; POZZOBON; PESSOA *et al.*, 2015).

A avaliação da GGT é indicada para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser uma enzima originária das membranas dos canalículos e ductos biliares (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008). O aumento da atividade sérica da enzima Gama-Glutamil-Transferase (GGT) até valores variando de 181-799 U/L (valores de referência: 6.1-17.4 U/L), é comumente observado em casos de colestase. A enzima GGT permanece alta ao longo do curso da doença, e é considerado o melhor parâmetro bioquímico para o diagnóstico de intoxicação por *Senecio spp.*, tendo em vista que todos os outros parâmetros hematológicos e sorológicos se mantem dentro dos limites normais (GIARETTA; PANZIERA; GALIZA; BRUM *et al.*, 2014).

A insuficiência hepática ocorre somente em lesões difusas quando há comprometimento de 75% do parênquima hepático, como ocorre nas intoxicações, onde a apresentação clínica observada quando o animal atinge um quadro de insuficiência hepática normalmente é a icterícia, edema, hemorragias, fotossensibilização e encefalopatia hepática (SANTOS; RIET-CORREA; SIMÕES; BARROS, 2008).

Em um estudo realizado por (KRABBE; GONÇALVES; POZZOBON; PESSOA *et al.*, 2015) quatro vacas prenhes que apresentaram lesões hepáticas clássicas da intoxicação por *Senecio spp.* tiveram seus ovários avaliados histologicamente, cujas células luteais grandes apresentavam megalocitose e pseudoinclusões nucleares. Algumas células luteais grandes apresentaram núcleos com até 23,69µm de diâmetro, o que permitiu concluir que a intoxicação por *Senecio spp.* causa alterações ovarianas em vacas, podendo causar perdas reprodutivas.

2.3.1 *Senecio spp.* no Rio Grande do Sul

O gênero *Senecio* pertence à família Asteraceae, uma planta cosmopolita, com a maior distribuição na América do Sul e cerca de 500 espécies. Somente não ocorre *Senecio* spp. nas regiões polares e na Amazônia. No Brasil, há 128 espécies deste gênero, embora algumas delas sejam pouco comuns (KARAM; SCHILD; MELLO, 2011).

A intoxicação por plantas do gênero *Senecio* é a principal causa de morte de bovinos na região central do Rio Grande do Sul (GIARETTA; PANZIERA; GALIZA; BRUM *et al.*, 2014). Plantas do gênero *Senecio* são nativas em várias regiões do mundo e consideradas causadoras de uma enfermidade de caráter enzoótico em bovinos, com importante reflexo na produção animal (BASILE; FERRAZ DINIZ; OKANO; CIRIO *et al.*, 2005). No RS o maior risco de ingestão de *Senecio* spp. ocorre pelo pastoreio direto, em épocas de pouca oferta de pasto, uma vez que a planta é pouco palatável (KARAM; SCHILD; MELLO, 2011).

Em um estudo que elucidou causas de morte de bovinos no Brasil, a intoxicação por *Senecio* spp. representou 3,8% do total, um valor abaixo dos observados em outros trabalhos desenvolvidos no Rio Grande do Sul (MELLO; BIANCHI; BANDINELLI; SONNE *et al.*, 2017). Em um estudo realizado na região central do Rio Grande do Sul, a intoxicação por *Senecio* spp. foi a principal causa de morte de bovinos, todavia somente 20% do total dos bovinos que morreram intoxicados por *Senecio* spp. eram de raças leiteiras, visto que a maioria dos casos são detectados na bovinocultura de corte, cuja criação é extensiva (LUCENA; PIEREZAN; KOMMERS; IRIGOYEN *et al.*, 2010)

Senecio spp. é a planta tóxica mais importante do estado e é responsável por 50% de todas as mortes de bovinos em decorrência de intoxicações (GRECCO; ESTIMA-SILVA; MARCOLONGO-PEREIRA; SOARES *et al.*, 2012). Diversas espécies de *Senecio* estão amplamente difundidas nas pastagens de propriedades rurais do Sul do Brasil, local em que se tem relato de quedas nos índices reprodutivos dos rebanhos bovinos, muitas vezes de causas não determinadas, o que levanta a suspeita de que a intoxicação por *Senecio* spp. leve a alterações ovarianas em vacas e possivelmente cause perdas reprodutivas nos rebanhos bovinos da região (KRABBE; GONÇALVES; POZZOBON; PESSOA *et al.*, 2015).

2.4 RECONHECIMENTO MATERNO E MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o conceito sinaliza sua presença para a mãe, período que ocorre o alongamento do embrião, coincidindo com a máxima produção de interferon tau (ANTONIAZZI; HENKES; OLIVEIRA; HANSEN, 2011). O interferon-tau é produzido pelo trofoblasto, secretado pelo

embrião para sinalizar sua presença à mãe a fim dela fornecer secreção de progesterona lútea necessária para o estabelecimento da gestação (FARIN; IMAKAWA; M ROBERTS, 1989). O mesmo é secretado em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do concepto (embrião e anexos embrionários) de ruminantes antes da implantação (FARIN; IMAKAWA; M ROBERTS, 1989).

O interferon tau é um interferon do tipo I que é o sinal para reconhecimento materno da gestação (BAZER; SPENCER; OTT, 1997). É produzido pelo concepto e age de maneira parácrina no útero, inibindo a expressão dos receptores de estrógeno (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no epitélio luminal do endométrio, evitando a produção pulsátil de PGF, hormônio responsável pela regressão do corpo lúteo ou luteólise (BAZER; SPENCER; OTT, 1997).

Além disso, intervém na fisiologia materna, bloqueando a ciclicidade ovariana e o desenvolvimento do mecanismo luteolítico uterino, ou seja, liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F_{2α} (PGF), o que garante a manutenção da produção de progesterona pelo corpo lúteo (CL) (BAZER; SPENCER; OTT, 1997; ROBERTS; CHEN; EZASHI; WALKER, 2008). O interferon tau é produzido em ovelhas gestantes entre os dias 11 e 23, com pico de produção ocorrendo entre dias 14 e 16 após o estro. Já no bovino, a secreção ocorre entre o 12º e o 26º dia, o pico de produção de interferon tau ocorre entre os dias 17 e 18 pós-estro (FARIN; IMAKAWA; M ROBERTS, 1989; NISWENDER; JUENGEL; SILVA; ROLLYSON *et al.*, 2000).

2.4.1 Síntese de Progesterona

O colesterol e os ésteres de colesterol (triacilgliceróis e fosfolípidos) que são essencialmente insolúveis em água são transportados no sangue como lipoproteínas plasmáticas, que são complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas. Nos mamíferos a produção de colesterol é regulada pela concentração intracelular de colesterol e pelos hormônios glucagon e insulina (NELSON; COX, 2012).

Os hormônios esteroides são produzidos a partir do colesterol, e entre eles está a progesterona, que regula o ciclo reprodutivo da fêmea. A síntese de hormônios esteroides requer a remoção de alguns ou de todos os carbonos da cadeia lateral do C-17 do anel D do colesterol, que ocorre na mitocôndria dos tecidos esteroideogênicos e envolve a hidroxilação de dois carbonos adjacentes na cadeia lateral (C-20 e C-22) seguindo-se a clivagem da ligação entre eles. Essas reações de hidroxilação e oxigenação são catalizadas por oxidases que utilizam NADPH, O₂ e citocromo P-450 mitocondrial, sendo a P450 (P450_{scc}) a enzima

responsável pelas hidroxilações nas posições 20 e 22 e depois clivagem entre estes dois carbonos, catalisando a conversão de colesterol em pregnenolona (NELSON; COX, 2012; WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014).

A pregnenolona possui dois resíduos hidrofílicos que aumentam a mobilidade através das membranas celulares. A pregnenolona difunde-se das mitocôndrias para o retículo endoplasmático liso onde é convertida em progesterona pela enzima 3- β hidroxisteróide desidrogenase (3 β HSD). Esta reação final produz uma ligação dupla entre o carbono 4 e 5 da molécula, a qual se difunde das células lúteas para a corrente sanguínea onde é transportada para os tecidos alvo (WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014).

A produção de progesterona é realizada pelas células esteroideogênicas grandes e pequenas do corpo lúteo, uma glândula temporária que se forma após a ovulação e que sintetiza o hormônio necessário no período gestacional para a formação e manutenção embrionária (MARTIN; FERREIRA, 2009).

Inadequadas concentrações de progesterona, principalmente no início da gestação culminam em perda embrionária (LEMLEY; WILMOTH; TAGER; KRAUSE *et al.*, 2009) sendo a progesterona o hormônio relacionado a redução da perda embrionária precoce, por disponibilizar um ambiente uterino ideal nesse período crítico de desenvolvimento embrionário, onde a secreção de proteínas, a utilização de substratos e o metabolismo embrionário aumentam drasticamente (MORRIS; DISKIN, 2008).

A concentração de progesterona circulante é determinada pelo balanço entre a produção luteal e seu metabolismo hepático, o qual é determinado pelo fluxo de sangue. Vários métodos para elevar a concentração de progesterona durante a onda de crescimento folicular pré-ovulatório têm demonstrado aumentar as concepções/inseminação artificial e reduzir a ovulação dupla, promovendo o aumento da fertilidade. O volume de tecido luteal e a função de células luteais grandes são fatores primários determinantes da produção de P4 (WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014).

Durante os protocolos de inseminação artificial, as elevações na concentração de progesterona são alcançadas pelo aumento do número de estruturas por conta do desenvolvimento de corpo lúteo acessório ou por suplementação de progesterona exógena. Após a inseminação artificial, a progesterona circulante é limitante e necessária para o crescimento embrionário e estabelecimento e manutenção da gestação (WILTBANK; SOUZA; CARVALHO; CUNHA *et al.*, 2014).

21 ⁴ Instituto Nacional de Investigación Agropecuária (INIA), Estanzuela, Uruguay.

22

23 ***Corresponding author:** Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal

24 (BioRep), Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-

25 900, Santa Maria, RS, Brazil. **E-mail:** alfredo.antoniazzi@ufsm.br

26 Abstract

27 The aim of this study was to identify the relationship between energy balance
28 and some key blood metabolites in primiparous dairy cows with different reproductive
29 performance. Twenty primiparous Holstein-Friesian dairy cows were grouped according
30 to the interval (days) from calving to conception: early-conception (early-c; <100 days),
31 mid-conception group (mid-c; 100 – 150 days) and late-conception (late-c; >150 days)
32 group, and evaluated on days -7, 28, 56 and 90 postpartum. All groups showed positive
33 and similar energy balance as well as similar serum concentrations of HDL, urea-N and
34 progesterone at days 28 and 56 of lactation. At day 90 of lactation, the early-c group
35 showed a less intense ($P<0.05$) net energy balance (-1.09 versus -2.15 and -1.86
36 Mcal/day), lower concentrations of serum urea-N (3.28 versus 4.22 and 4.88 mg/dL)
37 and HDL cholesterol (0.84 versus 1.59 and 1.46 mmol/L) and higher serum
38 concentration of progesterone (8.13 versus 4.54 and 1.83 ng/mL) than cows of mid-c
39 and late-c groups, respectively. In conclusion, different from usually observed for
40 multiparous dairy cows, the energy balance during the first weeks of lactation was not a
41 determining factor affecting the reproductive performance of primiparous dairy cows in
42 the present study. Instead, the nutritional status and the serum concentration of urea-N
43 and progesterone at a later stage, after 56 days of lactation, seem to have a role on
44 delaying the pregnant status of these cows.

45

46 **Keywords:** *conception, cholesterol, urea-N, progesterone*

47

48 **Resumo**

49 O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre balanço energético e
50 concentração sanguínea de alguns metabólitos relevantes durante o início da lactação
51 em vacas leiteiras primíparas com diferentes desempenhos reprodutivos. Vinte vacas
52 leiteiras holandesas primíparas foram agrupadas de acordo com o intervalo parto-
53 concepção: precoce (<100 dias), intermediário (100 - 150 dias) e tardio (> 150 dias) e
54 foram avaliados nos dias -7, 28, 56 e 90 dias pós-parto. Todos os grupos apresentaram
55 balanço energético similar e positivo, assim como concentrações séricas similares de
56 HDL, N-uréia e progesterona nos dias 28 e 56 de lactação. Aos 90 dias de lactação, o
57 grupo de vacas precoce apresentou balanço energético menos intenso ($P<0.05$) (-1.09
58 versus -2.15 e -1.86 Mcal/dia), menor concentração sérica de N-uréia (3.28 versus 4.22
59 e 4.88 mg/dL) e colesterol-HDL (0.84 versus 1.59 e 1.46 mmol/L) e maior concentração
60 sérica de progesterona (8.13 versus 4.54 e 1.83 ng/mL) que vacas dos grupos
61 intermediário e tardio, respectivamente. Em conclusão, diferente do observado
62 usualmente em vacas múltíparas, o balanço energético durante as primeiras semanas de
63 lactação não foi um fator determinante do desempenho reprodutivo das vacas
64 primíparas do presente estudo. De fato, a condição nutricional e as concentrações
65 séricas de N-uréia e progesterona após 56 dias de lactação parecem ter impacto no
66 atraso da concepção destas vacas.

67

68 **Palavras-chave:** *concepção, colesterol, N-uréia, progesterone*

69

70 **Introduction**

71 Dairy cows are under negative energy balance (NEB) during the first weeks of
72 lactation as consequence of limited feed intake and increased milk production, which

73 peaks 4 to 6 weeks after calving (NRC, 2001). The intensity of the NEB is dependent on
74 the milk production, which is genetically determined, and energy intake, which is diet-
75 dependent. During NEB, the use of body reserves of fat and protein is necessary to
76 attend the demand for high milk yield (OSPINA et al., 2010) causing a change in the
77 metabolic and hormonal status (BARLETTA et al., 2017).

78 Preview studies have consistently reported that the intensity of NEB may
79 negatively affects the conception rates of dairy cows by increasing the incidence of
80 early embryonic mortality and, consequently, the return of ovarian activity after calving
81 (SARTORI & GUARDIEIRO, 2010). Negative energy balance consequences are
82 probably similar to under nutrition, and may manifest as delayed ovarian activity
83 interfering in pulsatile secretion of LH, which is essential for ovarian follicular
84 development (DISKIN et al., 2003). However, primiparous dairy cows usually did not
85 reach their tissues growth plateau at the first lactation and present lower reproductive
86 performance after calving than multiparous dairy cows (LUCY et al., 1992; MEIKLE et
87 al., 2004). The nutritional and hormonal variables involved on dairy cows' reproductive
88 performance were partially identified. For example, progesterone (P4) is a key hormone
89 supporting the early embryonic development which blood concentration is determined
90 by the balance between P4 production, primarily by the corpus luteum (CL), and P4
91 metabolism, primarily by the liver (WILTBank et al., 2014). In addition, most diets
92 offered to cows during the early lactation contains excessive levels of rumen degradable
93 protein, what leads to high levels of ammonia absorption from rumen, increased urea
94 production by the liver (DOSKA et al., 2012) and increased blood urea concentration
95 which negatively impacts embryo quality (RHOADS et al., 2006). In fact, the liver is an
96 overcharged organ, particularly during the NEB period, when it has to process

97 concomitantly nutrients coming from gut and from peripheral tissues (REYNOLDS,
98 1995). However, the impact of the nutritional condition on blood key metabolites and
99 their relationship with reproduction of primiparous dairy cows was not clearly
100 established.

101 The aim of this study was to identify the relationship between energy balance
102 and some key blood metabolites in primiparous dairy cows with different reproductive
103 performance.

104

105 **Material and methods**

106 This study is complementary and used blood samples and nutritional data
107 previously collected and reported by Capelesso et al. (2019). That experiment was
108 conducted at the Experimental Station of the Instituto Nacional de Investigación
109 Agropecuaria (INIA), Estanzuela, Uruguay, in accordance with regulations of the use of
110 animals in experimentation, education, and investigation established by the Ethics
111 Commission on the use of experimental animals of INIA (Proc. N° 2015.42). Briefly,
112 twenty primiparous Holstein-Friesian cows were selected two weeks before the
113 expected date of calving and blocked according to calving date, body weight (BW; 605
114 \pm 67.2 kg, mean \pm standard deviation), backfat thickness (3.6 ± 1.49 cm), and body
115 condition score (3.6 ± 0.29 , in a 1 to 5 point-scale), and assigned to either once or twice-
116 daily milking up to week 8 of lactation. The cows were milked at 0600 h or at 0600 h
117 and 1700 h for once or twice-daily milking. After week 8, all cows were milked twice
118 daily. All cows received the same diet throughout the experiment. Before calving (from
119 -28 days), the cows were fed total mixed ration (TMR), formulated to meet the
120 requirements of heifers weighing 590 kg (NRC, 2001). In the postpartum period, the

121 diet was formulated to meet the requirements of cows weighing 520 kg and producing
122 30 kg of milk per day. Seventy percent of the estimated (dry matter) DM intake (NRC,
123 2001) was individually offered as TMR (approximately 15.2 ± 1.2 kg of DM/cow per
124 day) after the morning milking. Following the afternoon milking, all cows grazed oat
125 (*Avena sativa* L., var. INIA Halley) pasture on paddocks size adjusted to provide 12 kg
126 of DM/cow per day. Intake of pasture and TMR was measured at weeks 1, 3, 4, 6 and 8
127 of lactation for 3 consecutive days per week. Individual milk yield was recorded
128 automatically at each milking, using DairyPlan C21 (GEA Farm Technologies,
129 Düsseldorf, Germany). The individual NEB was estimated at week 1, 3, 4, 6, and 8 of
130 lactation as previously described (CAPELESSO et al., 2019). The milk production in
131 Dairy cows is most profitable when conception occurs between 90 and 130 days
132 postpartum (GIORDANO et al., 2011). Previous studies have analyzed cows conceiving
133 by 100, 150 and beyond 150 days in milk (COOK & GREEN, 2016). For this reason,
134 the cows in our study were grouped in early conception (early-c) by 100 days in milk,
135 mid conception (mid-c) from 101 to 150 days in milk and late conception (late-c) group
136 that conceived beyond 151 days in milk.

137 Blood samples were collected from the jugular vein, in tubes without
138 anticoagulant, on days -7, 28, 56 and 90 of calving. The samples were kept at room
139 temperature for 1 h, refrigerated at 4°C for 2 h, centrifuged ($1000 \times g$ for 10 min at
140 20°C) and stored at -20°C for further analysis. The N-urea in serum was determined by
141 a colorimetry method using a commercial kit (Bioclin, MG, Brazil). The analysis of
142 total and HDL cholesterol were performed by an enzymatic colorimetric method (Advia
143 1800, Siemens, Erlangen, Germany) and the LDL concentration was calculated by the
144 Friedewald formula (SCHARNAGL et al., 2001). The progesterone analysis was

145 performed through the direct chemiluminescence method using the Acridinium Ester
146 Technology (Advia Centaur XP, Siemens, Erlangen, Germany). The number of days to
147 cows return to cyclicity was recorded by visual observation of the standing estrus. Then,
148 the cows were artificially inseminated and the number of artificial inseminations
149 necessary to conception was also recorded.

150 For data analysis, cows were allocated in three different groups, according to the
151 interval (days) from calving to conception: early-conception group (early-c; <100 days),
152 mid-conception group (mid-c; 100 – 150 days) and late-conception (late-c; >150 days).
153 The effect of group-treatment on variables was tested by the ANOVA with repeated
154 measures throughout the time. Differences between means were tested with the Tukey-
155 Kramer's HSD test. Data are presented as means \pm SEM. Significant differences were
156 stated at $P < 0.05$. Data that did not follow a normal distribution pattern (Shapiro-
157 Wilk's test) were transformed to logarithms. Homogeneity of variance was tested with
158 O'Brien and Brown-Forsythe's tests. All analytical procedures were performed with
159 JMP software (SAS Institute, USA) with treatment group as main effect and cow
160 replicate as a random variable in F-test. The effect of treatment was tested against each
161 variable including milking frequency as co-variable.

162

163 **Results**

164 Cows of the early-c group presented higher ($P < 0.05$) BCS (3.78) than cows of
165 other groups (3.25 for mid-c and 3.50 for late-c cows) on day 90, whereas no
166 differences on BCS between groups were observed on days -7, 28 and 56 of lactation
167 (Figure 1A). The energy balance (Figure 1B) was, on average of all groups, negative
168 only at 90 days whereas positive energy balance values were observed in days 28 and

169 56 of lactation. However, on day 90 of lactation, the early-c group had a less intense
170 NEB ($P<0.05$) (-1.09 Mcal/day) than cows of other groups (-2.15 for mid-c and -1.86
171 Mcal/day for late-c). The cows presented no difference in days necessary to return to
172 cyclicity (early-c: 31 days, mid-c: 30 days and late-c: 24 days) whereas the number of
173 artificial inseminations (AI) was lower in early-c group (AI=1) when compared to mid-c
174 group (AI=2) and late-c group (AI=3) (results not shown).

175 On day -7, lower concentrations of serum N-urea ($P<0.05$) were observed in
176 cows of early-c group (4.08 mg/dL) when compared to the mid-c (7.98 mg/dL) and late-
177 c groups (6.60 mg/dL), the same result observed on day 90 (3.28 mg/dL early-c; 4.22
178 mg/dL mid-c; 4.88 mg/dL late-c group) (Figure 1C). However, no differences between
179 groups were observed in the concentration of serum N-urea on days 28 and 56 of the
180 lactation. On day 90, but not in days -7, 28 and 56 of lactation, the HDL cholesterol
181 concentration (Figure 2A) in serum of cows of the early-c group was lower ($P<0.05$)
182 (0.84 mmol/L) than in cows of mid-c (1.59 mmol/L) and late-c (1.46 mmol/L) groups.
183 No differences were observed between groups for serum concentration of LDL
184 cholesterol (Figure 2B) and total cholesterol (Figure 2C). Serum concentration of
185 progesterone was similar for all groups in days -7, 28 and 56 of lactation (Figure 2D)
186 and was higher in cows of early-c group (8.13 ng/mL) than in cows of mid-c (4.54
187 ng/mL) and late-c (1.83 ng/mL) groups at 90 days of lactation.

188

189 **Discussion**

190 Dairy cows frequently have severe NEB during the first 30 days of
191 lactation, associated with longer intervals to first ovulation (BUTLER, 2001).
192 However, the energy balance in cows of the present study was positive during most

193 early lactation and, different from expected, it declined to negative values only by day
194 90 of lactation in all groups. These results suggest that the energy balance at early
195 lactation was not determinant of the reproductive performance of primiparous cows and
196 cannot explain the reason why mid-c and late-c cows did not get pregnant before 90
197 days. These results suggest that the pregnancy status of primiparous dairy cows in the
198 present study were influenced by factors occurring later, after the day 56 of lactation.

199 Between days 56 and 90 of lactation all cows experienced NEB, however, the
200 NEB in this period was less intense in early-c group. As consequence, these cows
201 presented a better BCS at 90 days of lactation. In addition, at 90 days of lactation, cows
202 of mid- and late-c groups showed increased serum urea-N concentration. High serum
203 N-urea concentration is inversely related to uterine pH and decreased pregnancy rates
204 in lactating cows (BUTLER et al., 1996). Moreover, relatively high concentrations of
205 serum N-urea may change the follicular, oviductal and uterine environment of cows,
206 impacting the viability and development of embryos (RHOADS et al., 2006).
207 Increased urea-N concentration in blood may be consequence of increased levels of
208 degradable protein intake, excessive absorption of amino acids from gut or during NEB,
209 when amino acids from tissues are deaminated into the liver of dairy cows (WRAY-
210 CAHEN et al., 1997; KRAFT et al., 2011). Once mid-c and late-c cows presented a
211 more intense NEB after 56 days of lactation, it is probably that these cows have
212 mobilized more amino acids from peripheral tissues during this period than cows of
213 early-c group in the present study.

214 Progesterone plays a key role in the reproductive events associated to estrous
215 cycle as well as establishment and maintenance of pregnancy (CLEMENTE et al.,
216 2009). Cholesterol is present in low (LDL) or high-density (HDL) lipoproteins and is

217 the precursor for biosynthesis of progesterone in ovarium (NISWENDER, 2002), which
218 production is regulated by the development of the corpus luteum after the LH surge
219 (WILTBANK et al., 2014) in addition to the constitutive production of progesterone by
220 the large luteal cells (BOGAN & NISWENDER, 2007). Moreover, HDL is the
221 predominant lipoprotein present in bovine follicular fluid and it is the main responsible
222 to stimulate progesterone production by luteal cells providing cholesterol substrate for
223 luteal steroidogenesis (GRUMMER & CARROLL, 1988; WILTBANK et al., 1989).
224 However, in an apparent contrast, the serum concentration of HDL at 90 days was lower
225 and the serum concentration of progesterone was higher in early-c group compared to
226 mid-c and late-c groups. There is not a clear explanation for this discrepancy. However,
227 it is possible that blood extraction of HDL by ovarium and, consequently, progesterone
228 synthesis, was increased of early-c cows at 90 days. In other way, increased blood
229 concentration of progesterone in early-c cows at 90 days of lactation could also be
230 consequence of decreased liver catabolism of this hormone by these cows.

231

232 **Conclusion**

233 Different from usually observed for multiparous dairy cows, the energy balance
234 during the first weeks of lactation was not a determining factor affecting the
235 reproductive performance of primiparous dairy cows in the present study. Instead, the
236 nutritional status and the serum concentration of urea-N and progesterone at a later
237 stage, after 56 days of lactation, seem to have a role on delaying the pregnant status of
238 these cows.

239

240

241 **Acknowledgements**

242 The authors thank Alsiane Capelesso, as well as the staff of INIA and UDELAR
243 for making the nutritional data available, the BioRep team at UFSM for serum analysis,
244 and FAPERGS, CAPES and CNPq for scholarship support.

245

246 **References**

247

248 BARLETTA, R. V., et al. Association of changes among body condition score during
249 the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility,
250 and health of Holstein cows. **Theriogenology**, v.104, p.30-36. 2017. Available from:
251 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.030>>. Accessed: 2019/11/02. doi:
252 10.1016/j.theriogenology.2017.07.030.

253

254 BOGAN, R. L.; G. D. NISWENDER. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal
255 cells may be mediated by tonically active protein kinase A. **Biology of reproduction**,
256 v.77, n.2, p.209-216. 2007. Available from:
257 <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.106.059618>>. Accessed: 2019/11/03. doi:
258 10.1095/biolreprod.106.059618.

259

260 BUTLER, W. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate
261 in postpartum dairy cows. **British Society of Animal Science Occasional Publication**.
262 p.133-145. 2001. Available from < <http://dx.doi.org/10.1017/S0263967X00033644>>.
263 Accessed: 2019/11/10. doi: 10.1017/S0263967X00033644.

264

265 BUTLER, W., et al. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in
266 lactating dairy cattle. **Journal of animal science**, v.74, n.4, p.858-865. 1996. Available
267 from < <http://dx.doi.org/10.2527/1996.744858x>>. Accessed: 2019/11/07. doi:
268 10.2527/1996.744858x.

269

270 CAPELESSO, A., et al. Reducing milking frequency in early lactation improved the
271 energy status but reduced milk yield during the whole lactation of primiparous Holstein
272 cows consuming a total mixed ration and pasture. **Journal of dairy science**, v.102,
273 n.10, p.8919-8930. 2019. Available from < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16629>>.
274 Accessed: 2019/11/04. doi: 10.3168/jds.2019-16629.

275

276 CLEMENTE, M., et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect
277 on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, n.3,
278 p.507-517. 2009. Available from < <http://dx.doi.org/10.1530/rep-09-0152>>.
279 Accessed:2019/11/12. doi: 10.1530/rep-09-0152.

280

281 COOK, J. G.; M. J. GREEN. Use of early lactation milk recording data to predict the
282 calving to conception interval in dairy herds. **J Dairy Sci**, v.99, n.6, p.4699-4706. 2016.

- 283 Available from < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10264>>. Accessed: 2020/05/26. doi:
284 10.3168/jds.2015-10264.
285
- 286 COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition,**
287 **2001.** Washington, DC: The National Academies Press. 2001. 408 p.
288
- 289 KRAFT, G., et al. Adaptations of hepatic amino acid uptake and net utilisation
290 contributes to nitrogen economy or waste in lambs fed nitrogen- or energy-deficient
291 diets. **Animal**, v. 5, p. 678 – 690. 2011. Available from < [http://dx.doi.org/](http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110002302)
292 [10.1017/S1751731110002302](http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110002302)>. Accessed: 2020/07/19. doi:
293 [10.1017/S1751731110002302](http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110002302).
294
- 295 DISKIN, M. G., et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones
296 and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3,
297 p.345-370. 2003. Available from: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00099-](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00099-X)
298 [X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00099-X)>. Accessed:2019/11/08. doi: [10.1016/S0378-4320\(03\)00099-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00099-X).
299
- 300 DOSKA, M. C., et al. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows.
301 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.692-697. 2012. Available from: <
302 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300032>>. Accessed:2019/11/02. doi:
303 [10.1590/S1516-35982012000300032](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300032).
304
- 305 GIORDANO, J. O., et al. An economic decision-making support system for selection of
306 reproductive management programs on dairy farms. **Journal Dairy Science**, v.94, n.12,
307 p.6216-32. 2011. Available from: < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4376>>. Accessed:
308 2020/05/20. doi: [10.3168/jds.2011-4376](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4376).
309
- 310 GRUMMER, R.; D. CARROLL. A review of lipoprotein cholesterol metabolism:
311 importance to ovarian function. **Journal of animal science**, v.66, n.12, p.3160-3173.
312 1988. Available from: < [http://dx.doi.org/ jas1988.66123160x](http://dx.doi.org/jas1988.66123160x)>. Accessed: 2019/11/03.
313 doi: [10.2527/jas1988.66123160x](http://dx.doi.org/10.2527/jas1988.66123160x).
314
- 315 LUCY, M., et al. Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and
316 energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. **Animal**
317 **Science**, v.54, n.3, p.323-331. 1992. Available from: <
318 <http://dx.doi.org/10.1017/S0003356100020778> >. Accessed: 2020/05/02. doi:
319 [10.1017/S0003356100020778](http://dx.doi.org/10.1017/S0003356100020778).
320
- 321 MEIKLE, A., et al. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and
322 reproductive parameters of the cow. **Reproduction**, v.127, n.6, p.727-737. 2004.
323 Available from: <<http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00080>>. Accessed: 2020/05/02. doi:
324 [10.1530/rep.1.00080](http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00080).
325
- 326 NISWENDER, G. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**,
327 v.123, n.3, p.333-339. 2002. Available from: <
328 <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1230333>>. Accessed: 2019/11/15. doi:
329 [10.1530/rep.0.1230333](http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1230333).
330

- 331 OSPINA, P. A., et al. Association between the proportion of sampled transition cows
332 with increased nonesterified fatty acids and B-hydroxybutyrate and disease incidence,
333 pregnancy rate, and milk production at the herd level. **Journal of dairy science**, v.93,
334 n.8, p.3595-3601. 2010. Available from: < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3074>>.
335 Accessed: 2019/11/04. doi: 10.3168/jds.2010-3074.
336
- 337 REYNOLDS, C.K. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In: VON
338 ENGELHARDT, W., LEONHARD-MAREK, S., BREVES, G, *et al.* (Eds) **Ruminant**
339 **physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. Stuttgart : Ferdinand
340 Enke Verlag, p.351-371, 1995.
341
- 342 RHOADS, M. L., et al. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on
343 viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.91,
344 n.1, p.1-10. 2006. Available from: <
345 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.02.009>>. Accessed: 2020/05/10. doi:
346 10.1016/j.anireprosci.2005.02.009.
347
- 348 SARTORI, R.; M. M. GUARDIEIRO. Fatores nutricionais associados à reprodução da
349 fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.422-432. 2010. Available
350 from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300047>>. Accessed: 2019/11/06.
351 doi: 10.1590/S1516-35982010001300047.
352
- 353 SCHARNAGL, H., et al. The Friedewald formula underestimates LDL cholesterol at
354 low concentrations. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v.39, n.5, p.426-
355 431. 2001. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2001.068> >. Accessed:
356 2019/11/06. doi: 10.1515/CCLM.2001.068.
357
- 358 WILTBANK, M. C., et al. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II.
359 Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F_{2α}. **Biology of**
360 **reproduction**, v.42, n.2, p.239-245. 1989. Available from: <
361 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod42.2.239>>. Accessed: 2019/11/10. doi:
362 10.1095/biolreprod42.2.239.
363
- 364 WILTBANK, M. C., et al. Physiological and practical effects of progesterone on
365 reproduction in dairy cattle. **Animal**, v.8, n.s1, p.70-81. 2014. Available from: <
366 <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731114000585>>. Accessed: 2019/11/03. doi:
367 10.1017/s1751731114000585.
368
- 369 WRAY-CAHEN, D., et al. Hepatic response to increased exogenous supply of plasma
370 amino acids by infusion into the mesenteric vein of Holstein-Friesian cows in late
371 gestation. **British Journal of Nutrition**, v. 78, p.913-930.1997. Available from: <
372 <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19970209>>. Accessed: 2020/07/19. doi:
373 10.1079/BJN19970209.
374

375 **Figure captions:**

376 **Figure 1** - Body condition score (A), energy balance (B), serum N-urea (C) and
377 Milk production (D) of Holstein heifers allocated into one of three distinct groups
378 according to calving to conception intervals: early-conception group (early-c; <100
379 days), mid-conception group (mid-c; 100 – 150 days), and late-conception group (late-c;
380 >150 days). Data presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * P <0.05
381 (n =20).

382 **Figure 2** - HDL (A), LDL (B), total (C) cholesterol and serum progesterone (D)
383 concentration of Holstein heifers allocated into one of three distinct groups according to
384 calving to conception intervals: early-conception group (early-c; <100 days), mid-
385 conception group (mid-c; 100 – 150 days), and late-conception group (late-c; >150
386 days). Data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * P <0.05
387 (n =20).

Fig1

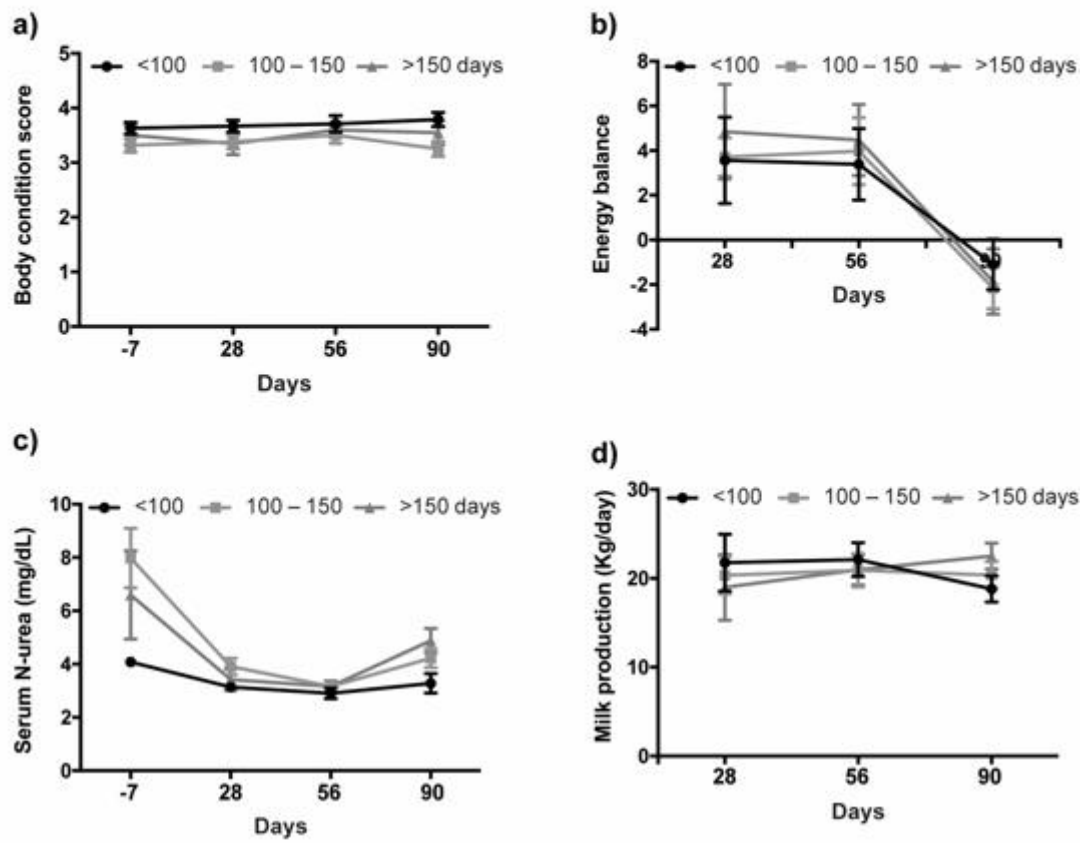
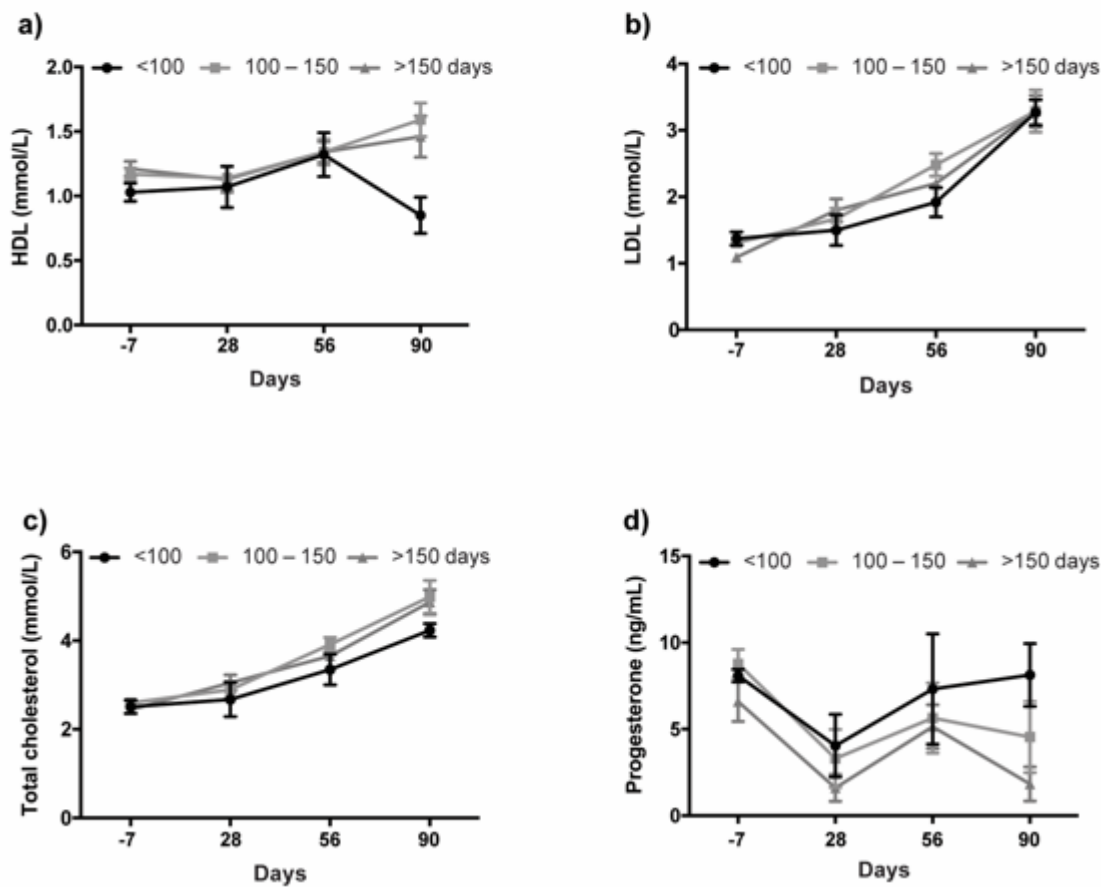


Fig2



4 CAPÍTULO II – MANUSCRITO II – IMPACT OF SENECIOSIS IN EARLY EMBRYO DEVELOPMENT AND MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN BEEF CATTLE

Artigo a ser submetido para: Animal Reproduction Science

1 **Impact of Seneciosis in early embryo development and maternal recognition of**
2 **pregnancy in beef cattle**

3

4 **Simone Stefanello¹, Carolina dos Santos Amaral¹, Igor Gabriel Zappe¹, Lady**
5 **Katerine Serrano Mujica¹ Mariani Farias Fiorenza¹, Gabrielle Rebeca Everling**
6 **Correa¹, Fabricio Amadori Machado¹, Kalyne Bertolin¹, Adriano Ramos³, Valério**
7 **Marques Portela Junior¹, Mauren Picada Emanuelli², Alfredo Quités Antoniazzi^{1*}**

8

9 ¹Laboratório de Biotecnologia e Reprodução- BioRep, Universidade Federal Santa
10 Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

11 ² Universidade Federal do Pampa, BR 472- Km 585, ZIP code 97501-970,
12 Uruguaiana, RS, Brazil.

13 ³ Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Ulysses Gaboardi, km 3, ZIP Code
14 89.520-000, Curitibanos, SC.

15

16 ***Corresponding author:** Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction -
17 BioRep, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-900, Santa
18 Maria, RS, Brazil. **E-mail:** alfredo.antoniazzi@ufsm.br

19 **Abstract**

20 This study aimed to estimate liver damage and its influence on maternal recognition of
21 pregnancy in beef cattle presenting natural ingestion of *Senecio* spp. Serum GGT activity is
22 the best biochemical marker for the diagnosis of *Senecio* spp toxicity, which can be used to
23 predict pregnancy based on liver damage. Liver damage was estimated by the measurement of
24 GGT activity. Additionally, it was included cytologic and histopathologic analyses to support
25 the diagnosis of Seneciosis. The cows were divided in two groups based on the serum GGT
26 activity: group 1 (GGT < 30 U/L) and group 2 (GGT > 31 U/L). The pregnancy rate and the
27 CL diameter were greater and concentration of progesterone on the cows from the group 1.
28 No difference on body condition scores was noted. Some cows presented a large CL on US
29 scanning, high concentration of progesterone, and high ISG15 mRNA expression on Day 19,
30 however they were an open cow on Day 45. These findings suggest that embryo loss beyond
31 D19 indicates embryonic mortality and may allow a better understanding of causes driving
32 corpus luteum insufficiency such as liver damage. In conclusion, despite the degree of hepatic
33 injury differed between the groups, the perception of corporal condition did not differ.
34 Microscopically lesions lead us to suggest there is impairment on the availability of nutrients
35 and progesterone necessary for embryonic survival, and potentially the embryo signaling may
36 not be effective.

37

38 **Keywords:** Embryo development; Gene expression; ISG15; Pregnancy rate;
39 Progesterone; *Senecio* spp.

40

41 **1. Introduction**

42

43 Poisoning by *Senecio* spp. plants is the major cause of cattle death in Southern Brazil
44 (Giaretta et al., 2014). Plants of the genus *Senecio* spp. are native to various regions of the
45 world and are considered to cause an enzootic disease in cattle (Basile et al., 2005).
46 Pyrrolizidine alkaloids (PA) are natural phytotoxins (Elias et al., 2011) that constitute the
47 genus *Senecio* spp. and cause irreversible damage to liver tissue (Barros et al., 2007). The
48 consequence of its toxicity impairs liver function (Cheeke, 1988) promoting structural and
49 functional changes in hepatocytes (Santos et al., 2008), and some studies suggest a sporadic
50 effect on other cells in the body having P-450 cytochrome, such as large steroidogenic cells in
51 the corpus luteum (CL) (Krabbe et al., 2015). Therefore, cholesterol and urea synthesis, and
52 progesterone metabolism may be compromised. The hepatic enzyme gamma glutamyl
53 transferase (GGT) indicates cholestasis diagnosis in ruminants, it is an enzyme originating
54 from the membranes of the bile ducts and canaliculi (Santos et al., 2008).

55 The main cause of reproductive failure in cattle is early embryonic mortality,
56 especially during the first 30 days of pregnancy (Wiltbank et al., 2016). After ovulation and
57 subsequent corpus luteum formation, blastocyst growth and fetal elongation are in part
58 dependent on the concentration of progesterone (Spencer et al., 2006). Serum concentration of
59 progesterone is determined by a balance between its production and hepatic metabolism
60 (Wiltbank et al., 2014). Furthermore, the adequate endometrial environment necessary for
61 embryo development is positively related to progesterone concentration, increasing factors
62 enabling the conceptus survival and growth (Spencer et al., 2015).

63 Maternal recognition of pregnancy is the physiological process which the concept
64 signals its presence to the mother (Spencer and Bazer, 2004) through the maximum
65 production of interferon tau (IFNT) (Imakawa et al., 1987), which promotes maternal
66 progesterone secretion needed for the establishment of pregnancy (Farin et al., 1989). IFNT
67 increases the expression of various interferon-stimulated genes (ISGs) in the uterus, corpus

68 luteum (CL), liver and leukocytes. In the CL specifically, IFNT stimulates the expression of
69 anti-apoptotic genes (Antoniazzi et al., 2013). As a consequence of endocrine action of IFNT
70 (Oliveira et al., 2007), the early pregnancy diagnosis is possible through the differential
71 expressions of ISGs mRNAs in peripheral blood cells during early embryonic development
72 (Kizaki et al., 2013). The analysis of gene expression in separate fractions of peripheral blood
73 leucocytes (PBL), especially the polymorphonuclear cells fraction (PMN) are most sensitive
74 to IFNT stimulation than the mononuclear cells fraction (PBMC), regarding a greater
75 correlation between ISGs expression and early pregnancy in bovines (Kizaki et al., 2013).

76 Therefore, our hypothesis is that pregnant beef cows presenting chronic liver injury
77 have lower blood *ISG15* mRNA expression. This study objective is to evaluate liver
78 parameters and the influence on maternal recognition of pregnancy in beef cattle presenting
79 natural ingestion of *Senecio* spp. Also, chronic liver injury, progesterone concentrations and
80 *ISG15* mRNA expression in polymorphonuclear cells were evaluated on Day 19 after
81 artificial insemination in animals with chronic *Senecio* spp. ingestion.

82

83 **2. Material and methods**

84

85 This study was carried out in Southern Brazil (30 ° 09'18.7 "S and 55 ° 03'08.6" W).
86 All experiments using animals were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA#
87 5284301018). All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Company
88 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

89

90 **2.1 Animals**

91 Thirty four Angus cows, aged 3 to 8 years old weighing around 450 kg, body
92 condition score from 4 and 6 points, considering a scale from 1 to 9 points (Richards et al.,

93 1986) were included on this study. The cows were kept in native pasture, with access to water
94 and mineral salt. All the animals were assessed for uterine conditions to select only animals
95 without any evident pathology on transrectal ultrasonography examination (Aquila PRO with
96 a 6.5 MHz linear transducer).

97

98 ***2.2 Experimental Design***

99 In order to determine the degree of liver damage, blood samples were collected 10
100 days prior to artificial insemination (Day -10) to evaluate the activity of serum gamma
101 glutamyl transferase (GGT). Subsequently, the animals had their estrous cycle synchronized
102 for fixed-time artificial insemination (FTAI), starting 10 days before the artificial
103 insemination (AI) day. The estrus cycle synchronization protocol was initiated by the
104 insertion of an intravaginal device (IVD) containing 1.9g of progesterone (CIDR, Zoetis, São
105 Paulo, Brazil), administration of 2mg (i.m.) of estradiol benzoate (Sincrodiol, Ourofino,
106 Minas Gerais, Brazil). Two days before AI (Day -2), IVD was withdrawn and the animals
107 received an injection of 25 mg (i.m.) of dinoprost prometamine, a synthetic prostaglandin F_{2α}
108 analogue (PGF; Lutalyze, Zoetis) and 1mg (i.m.) of estradiol cypionate (ECP; E.C.P. Zoetis).
109 AI was performed 48 hours (Day 0) after IVD withdrawal. The semen was obtained from a
110 commercial company stored in liquid nitrogen and thawing was performed at 37°C for 30
111 seconds for subsequent AI. The AI was done depositing the semen in the uterine body. Blood
112 samples were obtained on Days 0 and 19 to evaluate ISG15 mRNA on PMNs. Also, on Day
113 19 concentration of progesterone and liver biopsy were performed to identify liver damage by
114 cyto- and histopathologic analyses. Pregnancy diagnosis was performed by US scanning on
115 Day 45.

116

117 ***2.3 Liver Biopsy***

118 On D19, tissue fragments were collected for histologic and cytologic examination to
119 evaluate the presence of lesions compatible with chronic consumption of *Senecio* spp. Liver
120 biopsies were taken using a needle inserted into the 11th right intercostal space,
121 approximately 20cm below the backline, at the intersection of an imaginary line between the
122 ileum outer tuberosity and the scapula and another line perpendicular to the 11th intercostal
123 space (Barros et al., 2007).

124

125 ***2.4 Blood sample collection***

126 Blood was collected from the coccygeal vein using a 21G needle coupled to a vacuum
127 collection system (BD Vacutainer®) in 4 mL EDTA-containing tubes. The sampling was
128 performed prior to AI (Day-10), at the time of AI (Day 0) and after AI (Day 19). Blood
129 collection on the Day -10 from the beginning of the protocol was used to evaluate GGT and
130 on Day 19 following AI to evaluate the concentration of progesterone.

131

132 ***2.5 Isolation of polymorphonuclear (PMN) peripheral blood***

133 After blood collection, 2 mL of whole blood was diluted in 2mL of 0.9% NaCl and
134 then added on 3 mL of Ficoll-Paque PREMIUM®. Centrifugation was performed at 400xg
135 for 15 min at room temperature. After centrifugation the fractions of plasma were obtained:
136 PBMCs, Ficoll-Paque, PMN and erythrocytes. All the upper fractions were withdrawn to
137 collect the PMN fraction. Samples were stored in a cryotube at -80°C for subsequent total
138 RNA extraction. After isolation of PMN fraction, a glass-slide fraction-film was prepared to
139 determine the purity of each fraction. Slides were stained using a rapid stain (Diff-Quik
140 Differential Stains Set; Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the
141 manufacturer's recommendations. The cell fractions purity was accessed based on cell
142 morphology. PMN are classified as neutrophils, eosinophils and basophils. They have

143 condensed, segmented nuclei and are identified by the staining characteristics of their
144 secondary granules. An experienced clinical pathologist examined the slides. A differential
145 cell count was done by identifying 100 consecutive leukocytes using a 100x objective.
146 Samples above 95% of specific cell type (PMN) (Kizaki et al., 2013) were included in this
147 study.

148

149 ***2.6 RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR***

150 Total RNA was extracted from the PMN cells using Tri Reagent (BD), according to
151 the manufacturer's recommendations. Quantification and estimation of RNA purity was
152 performed using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA;
153 Absorbance 260 / 280nm ratio). RNA was treated with DNase Amplification Grade (Thermo
154 Fisher, Waltham, MA, USA) for 15 minutes at 27°C to neutralize any DNA molecules.
155 DNase was inactivated with 1µl EDTA for 10 minutes at 65 ° C. Reverse transcription was
156 performed adding iScript cDNA synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA, USA) for 5 minutes at
157 25°C followed by 30 minutes at 42°C and 5 minutes at 85°C. Quantitative polymerase chain
158 reaction (qPCR) was conducted in a thermocycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using 2µl of
159 cDNA and 8µl of MIX containing forward and reverse bovine specific primers (Table 1), free
160 water nucleases and GoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA).
161 Amplification was performed with initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 40
162 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing / extension at 60°C for 30
163 seconds. To optimize the RT-qPCR assays, serial dilutions of cDNA templates were used to
164 generate a standard curve, and efficiency between 90 and 110% and coefficient of
165 determination (R²) higher than 0.98 were considered. Samples were run in duplicate and the
166 results of all genes were expressed relative to GAPDH and RPS18 reference genes, according
167 to (Pfaffl, 2001).

168

169 ***2.7 Liver evaluation***

170 Considering that chronic exposure results in altered organ function, decreased organ
171 size and increased intrahepatic fibrous tissue, gamma glutamyl transferase (GGT) was
172 measured as an indicator of hepatic cholestasis. GGT analysis was performed on blood
173 samples obtained 10 days before insemination (day -10). It was used to separate the animals
174 into groups considering this enzyme as an indicator of liver injury by the enzymatic method
175 using Advia 1800 equipment (Siemens). For cytologic analysis, slides were made from each
176 liver fragment using the imprint technique, air-dried and stained with Diff-Quik[®] (Diff-Quik[®]
177 Differential Stain Set, American Scientific Products). Cytologic evaluation was based on the
178 typical histologic findings consistent with pyrrolizidine alkaloid toxicosis (megalocytosis,
179 biliary hyperplasia and fibrosis), as previous described (Emanuelli et al., 2016). Markedly
180 enlarged hepatocytes (megalocytes) defined megalocytosis; biliary hyperplasia was
181 determined based on the amounts of biliary epithelial cells; fibrosis was determined based on
182 the amounts of fibroblasts. We used a score system for cytology as follows: 0 (absent - 0%),
183 +1 (mild - <30%), +2 (moderate - 31%-70%) and +3 (marked - > 70%). Samples exhibiting
184 any degree of megalocytosis with or without the other findings were suggestive of seneciosis.

185 Liver fragments were then placed into 4% paraformaldehyde for 24h, processed as
186 following: ethyl alcohol dehydration, diaphanization in xylene, liquid ParaplastTM (Sigma,
187 Brazil), impregnation in a drying stove at 60°C, and ParaplastTM inclusion at room
188 temperature. The Paraplast blocks containing the tissues were sectioned using a microtome
189 (RM 2335, Leica Biosystems), adjusted for sections of 5 µm thickness on glass slides.
190 Afterward, each slide was stained with hematoxylin and eosin, as previously published
191 (Comim et al., 2015). Liver samples were scored considering fibrosis, megalocytosis, biliary

192 duct proliferation and the presence or absence of binucleated cells. Lesions were considered
193 mild <30%, moderate 30-70% and severe >70%.

194

195 ***2.8 CL diameter and progesterone analysis***

196 Corpora lutea diameter (mm) was measured on Day 19 following AI through ovarian
197 ultrasonography (Mindray DP10 with a 6.5 MHz linear transducer). The concentration of
198 progesterone was determined in plasma by chemiluminescent assay kit (ADVIA Centaur,
199 Siemens) on Day 19 following AI. The sensitivity of the assay was 0.15ng/mL of
200 progesterone.

201

202 ***2.9 Statistical analysis***

203 Cows were allocated in two different groups, according to the concentration of GGT:
204 group 1 (GGT <30) and group 2 (GGT >31). The effect of group-treatment on variables was
205 tested by the ANOVA with repeated measures throughout the time using the JMP software
206 (SAS Institute, USA). Differences between means were tested with the Tukey-Kramer's HSD
207 test. Data are presented as means \pm SEM. Significant differences were considered at $P<0.05$.

208

209 **3. Results**

210

211 ***3.1 Liver damage***

212 Initially all the cows were assessed for liver damage by the GGT activity, cytologic
213 and histopathologic analyses. Serum concentration of GGT in all cows ranged from <1 to 497
214 U/L. Fifty percent of GGT values were below 30 U/L (Smith, 2009). Consequently, the cows
215 were ranked in two groups: Group 1 (GGT < 30 U/L) was comprised of 17 animals and group
216 2 (GGT > 31 U/L) had 17 animals. Cytologic evaluation of the liver was successfully

217 performed on samples from 4 animals from group 1 and 4 animals from group 2. 12 samples
218 were no diagnostic due to lack of hepatic cells. From the diagnostic samples, four had mild
219 megalocytosis (+1) and three had moderate megalocytosis (+2). Increased number of biliary
220 epithelial cells suggesting biliary hyperplasia was noted in six of these samples, five scored
221 +1 and one scored +2. Fibroblasts were not seen in any sample. One sample had normal
222 hepatocytes. 7 samples were suggestive of Seneciosis. On the histologic slides, all liver
223 samples (n=8) presented megalocytosis, and the presence of binucleated cells. Samples
224 exhibiting any degree of megalocytosis with or without the other findings were suggestive of
225 Seneciosis (Figure 1).

226

227 ***3.2 Pregnancy status, CL diameter, concentration of progesterone and BCS***

228 Overall pregnancy rate was 32.35% (11/34). The pregnancy rate on group 1 (low
229 GGT) was 47.06% (8/17) while on group 2 (high GGT) was 17.65% (3/17) ($P=0.02$) (Figure
230 2A). The CL diameter on the cows from the group 1 was greater (19.82 mm) when compared
231 to cows from the group 2 (15.86mm) ($P<0.05$) (Figure 2B). The concentration of
232 progesterone on the cows from the group 1 was greater (11.18ng/ml) than the concentration
233 on group 2 (2.57 ng/ml) ($P<0.05$). The body condition score did not differ on all cows from
234 the experiment.

235

236 ***3.3 ISG15 mRNA expression on blood PMNs***

237 The expression of ISG15 mRNA in blood PMNs had no difference on both Days 0 and
238 19 considering groups 1 and 2. Also pregnant cows had no difference on ISG15 mRNA
239 expression when comparing the two groups (low and high GGT). ISG15 mRNA expression
240 had no correlation to pregnancy status neither CL diameter and concentration of progesterone.

241

242 4. Discussion

243 The *Senecio* spp. consumption leads to pyrrolizidine alkaloids (PA) ingestion, which
244 are natural phytotoxins (Elias et al., 2011), and cause irreversible damage to the liver,
245 impairing liver function (Cheeke, 1988). GGT evaluation is indicated for the diagnosis of
246 cholestasis in ruminants, as it is an enzyme associated with cell membranes of the bile ducts
247 and channels (Santos et al., 2008). It is also considered the best biochemical marker for the
248 diagnosis of *Senecio* spp. toxicity, due to unremarkable changes in all other hematological and
249 biochemical parameters (Giaretta et al., 2014). For this reason, the cows in the present study
250 were divided into two groups according to the blood concentration of GGT as indicative of
251 liver damage, confirmed by cytologic and histologic analyses.

252 The liver is considered the main organ in the metabolism and distribution of nutrients
253 (Kozloski, 2011) and it is responsible for cholesterol synthesis and progesterone clearance
254 (Wiltbank et al., 2014). Some disorders, as fatty liver, also interfere with reproductive
255 performance in dairy cows (Bertoni et al., 2008). In the present study, beef cows diagnosed
256 with *Seneciosis*, may have their reproductive performance compromised. In the group
257 presenting GGT concentration lower than 30, the pregnancy rate was close to 50%, while in
258 the group presenting GGT above 30, the pregnancy rate was under 20%. Therefore, the
259 activity of GGT may be a useful method to identify cows with moderate to severe liver
260 damage and diminished chance to become pregnant.

261 The use of cytology as a fast-diagnostic method (Emanuelli et al., 2016) and the
262 histology as the gold standard (Barros et al., 2007) to diagnose *Senecio spp* poisoning,
263 allowed the detection of seneciosis in all the cows in the present study. Cholesterol on low or
264 high density lipoprotein forms is the precursor for progesterone biosynthesis (Niswender et
265 al., 2000). Greater concentrations of cholesterol are related to steroidogenic enhancing
266 capacity of first-wave dominant follicles, the diameter of dominant follicles in early

267 postpartum, and increasing estradiol levels during the first follicular wave resulting in a
268 shorter anovulatory interval (Butler et al., 1996). Progesterone production is regulated by the
269 development of the corpus luteum after the LH peak, the number of granular cells that
270 luteinize into large luteal cells and the constitutive progesterone production by the large luteal
271 cells (Bogan and Niswender, 2007). Furthermore, circulating progesterone concentration is
272 determined by the balance between luteal production and its hepatic metabolism, which is
273 determined by blood flow (Nelson and Cox, 2012; Wiltbank et al., 2014). The increase in
274 circulating progesterone concentrations in the postovulatory period promotes an increase in
275 pregnancy rate (Forde et al., 2009).

276 In the present study CL diameter and progesterone concentration were lower in Group
277 2 when compared to Group 1. This may be explained by the less available precursor due to
278 liver damage in the cows, confirmed by elevated concentration of GGT (Group 2). Also,
279 indirect effects on embryo survival due to the lower availability of nutrients released in
280 general circulation or directly by interference with progesterone synthesis may impaired the
281 growth of CL and progesterone levels. CL diameter is directly related to serum concentration
282 of progesterone (Assey et al., 1993). Although liver injury interferes with the beef cattle BCS
283 (Liston et al., 2004), in our study this interference was not significant and did not affect the
284 reproductive variables in the study. No difference on body condition was noted between the
285 groups. *Seneciosis* promotes liver disease by accumulation of pyrolizidinic alkaloids in the
286 liver, and the main finding is hepatic megalocytosis (Barros et al., 2007); Interestingly, the
287 same lesion was described recently in large luteal cells (Krabbe et al., 2015). This may
288 influence the smaller CL and lower concentration on progesterone in cows with elevated
289 concentrations of GGT.

290 IFNT is produced by the conceptus in early pregnancy and acts on the endometrium to
291 abrogating estrogen and oxytocin receptor gene expression, which prevents luteolytic pulses

292 of prostaglandin F₂ α (Spencer and Bazer, 1996), additionally IFNT leaves the uterus through
293 uterine vein increasing the expression of various interferon-stimulated genes (ISGs) in the
294 uterus, corpus luteum, and blood cells (Oliveira et al., 2008; Bott et al., 2010). High
295 progesterone concentrations are essential in the post-conception period to stimulate conceptus
296 elongation, to increase IFNT production, and to improve pregnancy rates (Carter et al., 2008).

297 ISG15 expression is induced by IFNT in the blood of pregnant dairy cows (Han et al.,
298 2006). It was observed that the expression of ISG15, OAS1, MX1 and MX2 mRNA in the
299 blood neutrophils of pregnant cows was higher between days 8 and 42 of gestation (Sheikh et
300 al., 2018). In our study, no difference in ISG15 mRNA expression was observed on Day 19
301 following AI when comparing concentration of GGT, pregnancy status and their interaction.
302 It's know during pregnancy in sheep there is ISG15 mRNA expression only in pregnant ewes
303 (Romero et al., 2015). Also, it has been shown in cattle (Sheikh et al., 2018). In this study,
304 there were some cows presenting a large CL on US scanning, high concentration of
305 progesterone, and high ISG15 mRNA expression on Day 19, and they were an open cow on
306 Day 45. This suggests an embryo loss beyond D19. Moreover, it was also observed in our
307 study that Group I showed increased ISG15 expression on day 19 compared to day 0 in 23%
308 of undiagnosed cows, while Group II showed 47% of undiagnosed cows. According to (Han
309 et al., 2006) this phenomenon may indicate that cows are in the process of embryonic
310 mortality perhaps related to corpus luteum insufficiency, changes in endometrial release and
311 cellular response to IFNT. Therefore, interferon tau-stimulated gene expression in neutrophils
312 may act as an indicator of embryonic mortality (Sheikh et al., 2018).

313 Considering the increase on ISG15 mRNA expression on Day 19 compared to Day 0,
314 it was possible to observe that part of the cows had increased rate of *ISG15* mRNA
315 expression; however, they were diagnosed as not pregnant, which may be associated to a
316 possible embryonic loss.

317

318 **5. Conclusion**

319 In conclusion, serum levels of GGT indicated hepatic damage, confirmed by
320 histological analysis, which was compatible with Seneciosis. Reducing hepatic function
321 compromises CL diameter, concentration of progesterone and the availability of nutrients
322 necessary to embryonic survival and the recognition of pregnancy. The different levels of
323 hepatic damage impact embryonic development prior to weight loss and decline in body
324 condition score, suggesting serum concentration of GGT may be an indicator before
325 breeding season.

326

327 **Acknowledgements**

328 The authors thank to Campo de Instrução Barão de São Borja - EB for
329 providing the animals for the study.

330

331 **Declaration of Competing Interest**

332 The authors have nothing to declare.

333

334 **Funding**

335 This study was supported by CAPES Brazil, FAPERGS and National Council
336 for Scientific and Technological Development (CNPq).

337

338 **References**

339 Antoniazzi, A.Q., Webb, B.T., Romero, J.J., Ashley, R.L., Smirnova, N.P., Henkes, L.E.,
340 Bott, R.C., Oliveira, J.F., Niswender, G.D., Bazer, F.W., 2013. Endocrine delivery of
341 interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in
342 ewes. *Biology of reproduction* 88, 144, 141-112.
343 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105684>

- 344 Assey, R.J., Purwantara, B., Greve, T., Hyttel, P., Schmidt, M.H., 1993. Corpus luteum size
345 and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology*
346 39, 1321-1330. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90234-V](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90234-V)
- 347 Barros, C.S.L., Castilhos, L.M.L., Rissi, D.R., Kommers, G.D., Rech, R.R., 2007. Biópsia
348 hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos.
349 *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100010>
- 351 Basile, J.R., Ferraz Diniz, J.M., Okano, W., Cirio, S.M., Leite, L.C., 2005. Intoxicação por
352 *Senecio* spp.(Compositae) em bovinos no sul do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* 33.
353 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000700010>
- 354 Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M., 2008. Effects of inflammatory conditions on
355 liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal*
356 *of dairy science* 91, 3300-3310. doi: 10.3168/jds.2008-0995.
- 357 Bogan, R.L., Niswender, G.D., 2007. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal cells
358 may be mediated by tonically active protein kinase A. *Biology of reproduction* 77, 209-216.
359 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059618>
- 360 Bott, R.C., Ashley, R.L., Henkes, L.E., Antoniazzi, A.Q., Bruemmer, J.E., Niswender, G.D.,
361 Bazer, F.W., Spencer, T.E., Smirnova, N.P., Anthony, R.V., 2010. Uterine vein infusion of
362 interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biology of reproduction* 82, 725-735.
363 doi: 10.1095/biolreprod.109.079467.
- 364 Butler, W.R., Calaman, J.J., Beam, S.W., 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to
365 pregnancy rate in lactating dairy cattle. *Journal of animal science* 74, 858-865.
366 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12009>
- 367 Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C.O., Kenny,
368 D.A., Roche, J.F., Lonergan, P., 2008. Effect of increasing progesterone concentration from
369 Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.
370 *Reproduction, Fertility and Development* 20, 368-375. DOI: 10.1071/RD07204
- 371 Cheeke, P.R., 1988. Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids1. *Journal of animal*
372 *science* 66, 2343-2350. doi: 10.1530/JOE-14-0150
- 373 Comim, F.V., Hardy, K., Robinson, J., Franks, S., 2015. Disorders of follicle development
374 and steroidogenesis in ovaries of androgenised foetal sheep. 225, 39. doi: 10.1530/JOE-14-
375 0150.
- 376 Elias, F., Latorre, A., Pípole, F., Haraguchi, M., Górnaiak, S., Hueza, I., 2011. Haematological
377 and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from
378 *Senecio brasiliensis*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.032>
- 379 Emanuelli, M.P., Antoniazzi, A.Q., Cecim, M.S., Figuera, R.A., 2016. What is your
380 diagnosis? Liver from a cow. *Veterinary Clinical Pathology* 45, 721-722. doi:
381 10.1111/vcp.12414
- 382 Farin, E.C., Imakawa, K., M Roberts, R., 1989. In Situ Localization of mRNA for the
383 Interferon, Ovine Trophoblast Protein1, during Early Embryonic Development of the Sheep.
- 384 Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C.O., Spencer, T.E., Bazer, F.W.,
385 McBride, R., Boland, M.P., O'Gaora, P., Lonergan, P., Roche, J.F., 2009. Progesterone-
386 Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus
387 Development in Cattle1. *Biology of Reproduction* 81, 784-794.
388 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074336>
- 389 Giaretta, P.R., Panziera, W., Galiza, G.J.A., Brum, J.S., Bianchi, R.M., Hammerschmitt,
390 M.E., Bazzi, T., Barros, C.S.L., 2014. Seneciosis in cattle associated with photosensitization.
391 *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34, 427-432. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000500007>

- 393 Han, H., Austin, K.J., Rempel, L.A., Hansen, T.R., 2006. Low blood ISG15 mRNA and
394 progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. 191, 505.
395 <https://doi.org/10.1677/joe.1.07015>
- 396 Imakawa, K., Anthony, R.V., Kazemi, M., Marotti, K.R., Polites, H.G., Roberts, R.M., 1987.
397 Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm.
398 Nature 330, 377-379.
- 399 Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K.,
400 2013. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Reprod Biol*
401 *Endocrinol* 11, 6.
- 402 Kozloski, G.V., 2011. *Bioquímica Dos Ruminantes*. UFSM.
- 403 Krabbe, A.A., Gonçães, M.A., Pozzobon, R., Pessoa, C.R.M., Soares, M.P., Costa, R.A.,
404 Anjos, B.L., 2015. Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes com seneciose
405 crônica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35, 33-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100008>
- 407 Liston, M., Antoniazzi, A., Ramos, C., Cecim, M., 2004. Histopatologia, perfil bioquímico e
408 desempenho animal no prognóstico produtivo da intoxicação por Senecio spp.
- 409 Nelson, D.L., Cox, M.M., 2012. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- 410 Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000.
411 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological*
412 *Reviews* 80, 1-29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>
- 413 Oliveira, J., Henkes, L., Ashley, R., Purcell, S., Smirnova, N., Veeramachaneni, D., Anthony,
414 R., Hansen, T., 2008. Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extrauterine
415 Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- τ Release
416 from the Uterine Vein. *Endocrinology* 149, 1252-1259. DOI: 10.1210/en.2007-0863
- 417 Oliveira, J.F., Henkes, L.E., Ashley, R.L., Purcell, S.H., Smirnova, N.P., Veeramachaneni,
418 D.R., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2007. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in
419 extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- τ
420 release from the uterine vein. *Endocrinology* 149, 1252-1259.
421 <https://doi.org/10.1210/en.2007-0863>
- 422 Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
423 PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45-e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- 424 Richards, M.W., Spitzer, J.C., Warner, M.B., 1986. Effect of Varying Levels of Postpartum
425 Nutrition and Body Condition at Calving on Subsequent Reproductive Performance in Beef
426 Cattle1, 2, 3. *Journal of animal science* 62, 300-306. <https://doi.org/10.2527/jas1986.622300x>
- 427 Romero, J.J., Antoniazzi, A.Q., Nett, T.M., Ashley, R.L., Webb, B.T., Smirnova, N.P., Bott,
428 R.C., Bruemmer, J.E., Bazer, F.W., Anthony, R.V., 2015. Temporal release, paracrine and
429 endocrine actions of ovine conceptus-derived interferon-tau during early pregnancy. *Biology*
430 *of Reproduction* 93, 146, 141-110. doi: 10.1095/biolreprod.115.132860
- 431 Santos, J.C.A., Riet-Correa, F., Simões, S.V.D., Barros, C.S.L., 2008. Patogênese, sinais
432 clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos
433 no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100001>
- 435 Sheikh, A.A., Hooda, O.K., Kalyan, A., Kamboj, A., Mohammed, S., Alhussien, M., Reddi,
436 S., Shimray, P.G., Rautela, A., Pandita, S., Kapila, S., De, S., Dang, A.K., 2018. Interferon-
437 tau stimulated gene expression: A proxy to predict embryonic mortality in dairy cows.
438 *Theriogenology* 120, 61-67. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.028
- 439 Smith, B.P., 2009. Diseases of the alimentary tract. *Large animal internal medicine*, 593-789.
- 440 Spencer, T.E., Bazer, F.W., 1996. Ovine interferon tau suppresses transcription of the
441 estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 137,
442 1144-1147. DOI: 10.1210/en.137.3.1144

- 443 Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of
444 pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2, 49-49.
- 445 Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Palmarini, M., 2006. Pregnancy
446 recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone,
447 interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 65-78.
448 <https://doi.org/10.1071/RD06102>
- 449 Spencer, T., Forde, N., Lonergan, P., 2015. The role of progesterone and conceptus-derived
450 factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of dairy science* 99.
451 doi: 10.3168/jds.2015-10070
- 452 Wiltbank, M., Baez, G., García Guerra, A., Toledo, M., Monteiro, P., Melo, L., Ochoa, J.,
453 Santos, J., Sartori, R., 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of
454 gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86. DOI:
455 10.1016/j.theriogenology.2016.04.037
- 456 Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Carvalho, P.D., Cunha, A.P., Giordano, J.O., Fricke, P.M.,
457 Baez, G.M., Diskin, M.G., 2014. Physiological and practical effects of progesterone on
458 reproduction in dairy cattle. *animal* 8, 70-81. doi: 10.1017/S1751731114000585

459 **Tables**460 **Table 1.** Primers designed for quantitative real-time PCR analysis.

et	Targ number	Accession number	Primer sequence
<i>ISG15</i>		NM_174366.1	F: GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT R: ACCTCCCTGCTGTCAAGGT
<i>GAPDH</i>		NM_001034034.2	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA
<i>RPS18</i>		NM_001033614.2	F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC

461 F: Forward; R: Reverse.

462 **Figures**

463 **Figure 1-** (A) Serum concentration of GGT (U/L). Histological section of the liver showing
464 megalocytosis (red arrow) and binucleated cells (black arrow) (B and C), fibrosis and
465 proliferative biliary ducts (D) suggestive of seneciosis.

466
467 **Figure 2-** Corpus luteum diameter (A), pregnancy rate (B) and serum concentration of
468 progesterone (C) of cows presenting low (<30) and high (>30) level of GGT. * represents
469 difference $P < 0.05$.

470

471 **Figure 3-** ISG15mRNA expression in non-pregnant and pregnant cows presenting low (<30)
472 and high (>30) level of GGT.

Figure 1

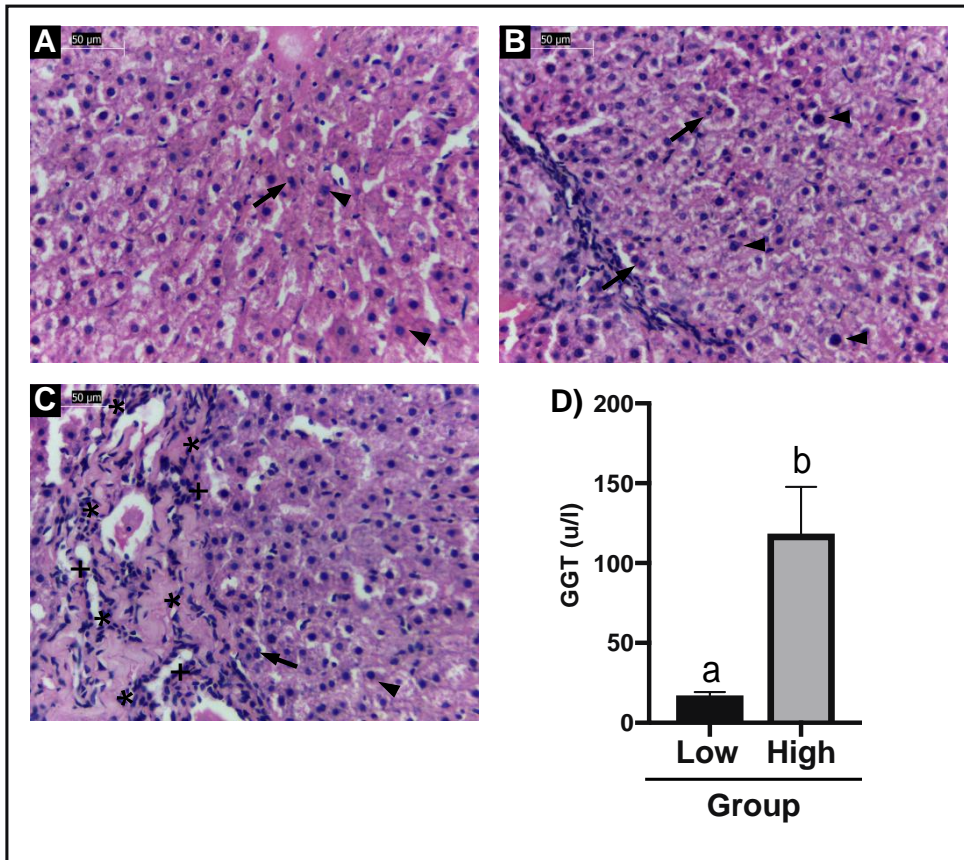


Figure 2

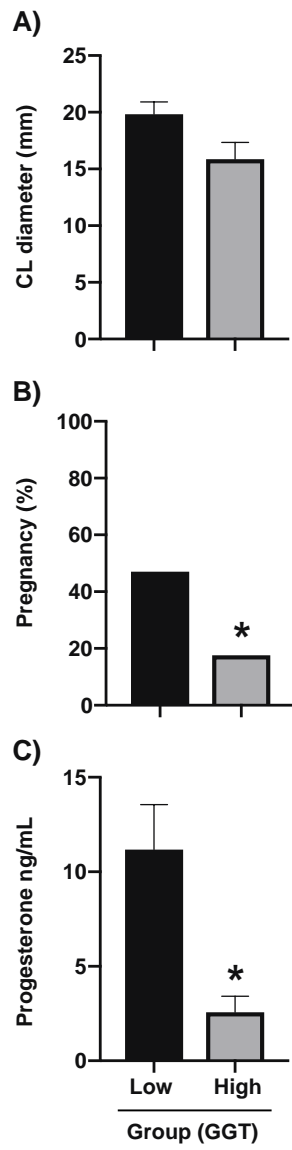
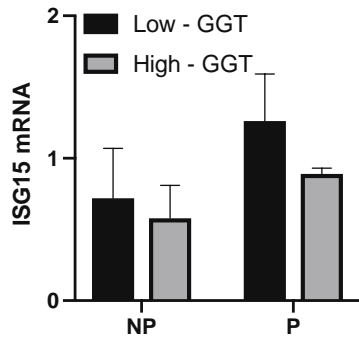


Figure 3



5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam que os sistemas do organismo são dependentes um do outro, e que a eficiência reprodutiva está intimamente associada a um animal nutricional e metabolicamente atendido em suas exigências e, além disso, dotado de saúde hepática.

No primeiro manuscrito foi possível observar que as vacas alimentadas de acordo com suas exigências de manutenção e produção de leite, retornaram a ciclicidade e apresentaram um menor intervalo entre o parto e a nova concepção, os quais indicam, em suma, que o animal prioriza sua sobrevivência, depois a sobrevivência da prole (produção de leite) e, por último, ativa a ciclicidade e o sistema reprodutivo. Dessa forma, uma condição nutricional adequada é necessária para que o animal tenha condições metabólicas de sintetizar os hormônios necessários para a manutenção da gestação. Observamos neste estudo que o colesterol LDL teve maior relação com a síntese de progesterona do que o colesterol HDL.

Além disso, foi observado que o fornecimento de uma dieta com sincronia entre degradação de componentes proteicos e energéticos é necessária, o que maximiza a síntese de proteína microbiana e diminui a concentração de ureia sanguínea. Outro fator a ser considerado é que toda a amônia ruminal captada e transformada em ureia a nível hepático representa um custo energético que compete pela energia disponível para a produção de leite. Também foi possível observar que concentrações de ureia sanguínea desde o pré-parto influenciaram o tempo de intervalo entre parto e a nova concepção, e que o período de transição é um período decisivo para a futura eficiência reprodutiva.

No segundo manuscrito foi observado a interferência da lesão hepática na eficiência reprodutiva, através da avaliação de dois grupos de animais com diferentes níveis de lesão hepática. Observamos que animais com menor lesão hepática (Grupo 1 com GGT<30 U/L) apresentaram maior taxa de prenhez, maior tamanho de corpo lúteo e maior concentração sanguínea de progesterona em relação ao grupo com menor lesão hepática (Grupo II com GGT>30 U/L). A decisão de utilizar a enzima GGT como parâmetro de determinação de níveis de lesão hepática por *Senécio spp.* para a formação dos grupos de animais em estudo foi apropriada, tendo em vista que a presença de lesões características de seneciose foram confirmadas através de exames de citologia e histopatologia.

Não foi observado diferença no escore de condição corporal nos grupos em estudo, apesar de apresentarem diferentes níveis de lesão hepática, não exercendo, assim, influencia nos parâmetros reprodutivos avaliados. Nesse estudo não foi observado diferença na expressão de *ISG15* mRNA entre os grupos nos Dias 0 e 19. Entretanto foi observado,

principalmente nas vacas pertencentes ao Grupo II, um aumento da expressão de *ISG15* mRNA no Dia 19, associada a um aumento na concentração sanguínea de progesterona e no tamanho de corpo lúteo. Porém essas mesmas vacas, no 45º dia, foram diagnosticadas vazias. Isso sugere a ocorrência de mortalidade embrionária, apesar de ter ocorrido a sinalização embrionária através do interferon tau. Também foi observado nesse estudo um menor tamanho médio de corpo lúteo e progesterona nas vacas pertencentes ao grupo II, pois as toxinas naturais contidas nas plantas de *Senecio spp* alteram o desenvolvimento de todas células contendo citocromo P-450.

Nos dois manuscritos foi observada a influência da ingestão de nutrientes para o bom funcionamento dos sistemas digestório e reprodutivo, que estes são dependentes e de que o fígado é o principal órgão mediador dessas funções. Para o funcionamento eficaz dos dois sistemas, a saúde hepática é fundamental, sendo observado que um fígado saudável recebe, modera e redistribui os metabólitos de forma satisfatória, o que dá suporte para a manutenção da gestação, principalmente por disponibilizar os precursores hormonais e nutrientes essenciais e por metabolizar agentes tóxicos que representam riscos.

6 CONCLUSÕES

A eficiência reprodutiva é determinada pelos metabólitos sanguíneos desde o período de transição, não estando assegurada pelo retorno precoce à ciclicidade. As maiores concentrações de ureia sanguínea são observadas em animais com maior intervalo entre parto e concepção e maior número de inseminações, comprovando o efeito negativo no desempenho reprodutivo.

A concentração da enzima GGT, além de indicativo de lesão hepática, pode ser utilizada como critério de determinação de probabilidade de gestação, mesmo em vacas que não apresentam nitidamente alteração no escore de condição corporal. Conclui-se que as vacas com lesão hepática severa emprenham menos e conseqüente menor concentração de progesterona devido ao menor tamanho de corpo lúteo, provavelmente ocasionado pelo consumo de *Senecio spp.* Além disso, apesar da sinalização embrionária comprovada pelo aumento da expressão de *ISG15* mRNA no Dia 19, um grande número de vacas não emprenhou, indicando que a lesão hepática de acordo com a sua intensidade prejudica a capacidade materna de manutenção do embrião viável.

REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, A. Q.; HENKES, L. E.; OLIVEIRA, J. F. C.; HANSEN, T. R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, 41, p. 176-185, 2011.

BACH, A.; ESPAÑA, P. **LA REPRODUCCIÓN DEL VACUNO LECHERO: NUTRICIÓN Y FISIOLOGÍA**. 2002.

BASILE, J. R.; FERRAZ DINIZ, J. M.; OKANO, W.; CIRIO, S. M. *et al.* Intoxicação por *Senecio* spp.(Compositae) em bovinos no sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33, n. 1, 2005.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C. *et al.* Comparative aspects of implantation. 138, n. 2, p. 195, 2009.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. **Interferon Tau: A Novel Pregnancy Recognition Signal**. 1997. 412-420 p.

BERGAMASCHI, M. A. C. M.; MACHADO, R.; BARBOSA, R. T. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.

BISINOTTO, R. S.; SANTOS, J. E. P. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, 24, n. 1, p. 258-266, 2011.

BOGAN, R. L.; NISWENDER, G. D. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal cells may be mediated by tonically active protein kinase A. **Biology of reproduction**, 77, n. 2, p. 209-216, 2007.

BUTLER, W. **Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows**. 2001. 133-145 p.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. **Journal of dairy science**, 72, n. 3, p. 767-783, 1989.

CHEEKE, P. R. Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids¹. **Journal of animal science**, 66, n. 9, p. 2343-2350, 1988.

COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001**. Washington, DC: The National Academies Press, 2001. 408 p. 978-0-309-06997-7.

DOSKA, M. C.; SILVA, D. F. F. d.; HORST, J. A.; VALLOTO, A. A. *et al.* Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41, p. 692-697, 2012.

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

ELIAS, F.; LATORRE, A.; PÍPOLE, F.; HARAGUCHI, M. *et al.* **Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from *Senecio brasiliensis***. 2011. 2313-2319 p.

ELROD, C. C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W. R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus¹. **Journal of Animal Science**, 71, n. 3, p. 702-706, 1993.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 144, n. 3, p. 60-71, 2014/01/30/ 2014.

FARIN, E. C.; IMAKAWA, K.; M ROBERTS, R. **In Situ Localization of mRNA for the Interferon, Ovine Trophoblast Protein1, during Early Embryonic Development of the Sheep**. 1989. 1099-1107 p.

GIARETTA, P. R.; PANZIERA, W.; GALIZA, G. J. A.; BRUM, J. S. *et al.* Seneciosis in cattle associated with photosensitization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34, p. 427-432, 2014.

GONZALEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. L. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária (1.; 2003, Porto Alegre)**, 2003.

GRECCO, F. B.; ESTIMA-SILVA, P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M. P. *et al.* Intoxicação experimental aguda por *Senecio brasiliensis* em ovinos e indução de resistência à intoxicação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32, n. 9, p. 912-916, 2012.

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Epidemiological aspects and hepatic lesions pattern in 35 outbreaks of *Senecio* spp. poisoning in cattle in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30, n. 5, p. 389-397, 2010.

HORTA, A. E. M. Fisiologia do puerpério na vaca. **Jornada Internales de Reproducción Animal**, 8, p. 73-84, 1995.

IWATA, H.; TANAKA, H.; KANKE, T.; SAKAGUCHI, Y. *et al.* Follicle Growth and Oocyte Developmental Competence in Cows With Liver Damage. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, 45, p. 888-895, 03/01 2010.

JUNGERMANN, K.; KEITZMANN, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. **Annual review of nutrition**, 16, n. 1, p. 179-203, 1996.

KARAM, F. C.; SCHILD, A. L.; MELLO, J. R. B. d. Intoxicação por Senecio spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31, p. 603-609, 2011.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica Dos Ruminantes**. 3 ed. UFSM, 2011. 212 p. 9788573911503.

KRABBE, A. A.; GONÇALVES, M. A.; POZZOBON, R.; PESSOA, C. R. M. *et al.* Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes com seneciose crônica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35, p. 33-38, 2015.

LEMLEY, C. O.; WILMOTH, T. A.; TAGER, L. R.; KRAUSE, M. *et al.* Effect of a High Corn Starch Diet on Insulin Concentrations, Cytochrome P450 2C and 3A Activity, and Progesterone Clearance in Dairy Cows. **Biology of Reproduction**, 81, n. Suppl_1, p. 137-137, 2009.

LEMO, A. J. G.; TRINDADE, E. J. INTERFERÊNCIAS NO EFEITO FARMACOLÓGICO MEDIADAS PELAS BIOTRANSFORMAÇÕES DOS CITOCROMOS P450. 2014.

LUCENA, R. B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F. *et al.* Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30, p. 428-434, 2010.

MACHADO, R.; BARBOSA, R.; SILVA, J.; BERGAMASCHI, M. *et al.* A redução da mortalidade embrionária-estratégia hormonal para otimizar a função luteínica em bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H.; MARQUES, J. *et al.* Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **PUBVET**, 2, n. 11, 2008.

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

MELLO, L.; BIANCHI, M. V.; BANDINELLI, M.; SONNE, L. *et al.* **Causas de morte em vacas leiteiras no Rio Grande do Sul.** 2017. 916-920 p.

MORAES, C. N. d.; MAIA, L.; ALVARENGA, F. d. C. L.; OBA, E. Considerações a respeito do pós-parto em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, p. 53-63, 2014.

MORRIS, D.; DISKIN, M. Effect of progesterone on embryo survival. **animal**, 2, n. 8, p. 1112-1119, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** W. H. Freeman, 2012. 9780716771081.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K. *et al.* Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. **Journal of dairy science**, 93, n. 8, p. 3595-3601, 2010.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; GILBERT, R. O.; TOOLE, R. *et al.* Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 91, n. 1, p. 1-10, 2006/01/01/ 2006.

ROBERTS, R. M.; CHEN, Y.; EZASHI, T.; WALKER, A. M. Interferons and the Maternal-Conceptus Dialog in Mammals. **Seminars in cell & developmental biology**, 19, n. 2, p. 170-177, 2008.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 28, p. 1-14, 2008.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; GENÉTICOS, E. R.; BIOTECNOLOGIA, B. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, 3, p. 175-194, 2008.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, p. 422-432, 2010.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. **Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina 1 Influence of feed intake on the reproductive physiology of the cow.** 2007.

STEFANELLO, S.; MEZZOMO, M.; ZENI, D.; EBLING, R. *et al.* Oxygen uptake and net flux of metabolites by splanchnic tissues of sheep in response to short-term mesenteric infusion of nitrogenous compounds. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102, n. 4, p. 853-860, 2018.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; CUNHA, A. P. *et al.* Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **animal**, 8, n. s1, p. 70-81, 2014.