

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



INFLUÊNCIA DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR RICO EM AGPI ÓMEGA-3 NO RETORNO  
À ATIVIDADE LÚTEA E NA FERTILIDADE NO PÓS-PARTO EM BOVINOS LEITEIROS

INÊS GONÇALVES FAUSTINO DUARTE

ORIENTADOR(A):

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

TUTOR(A):

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá  
Guerreiro

2024

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



INFLUÊNCIA DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR RICO EM AGPI ÓMEGA-3 NO RETORNO  
À ATIVIDADE LÚTEA E NA FERTILIDADE NO PÓS-PARTO EM BOVINOS LEITEIROS

INÊS GONÇALVES FAUSTINO DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

VOGAIS:

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Doutor João Nestor Chagas e Silva

ORIENTADOR(A):

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

TUTOR(A):

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá  
Guerreiro

2024

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Inês Gonçalves Faustino Duarte

Título da Tese ou Dissertação: Influência de um suplemento rico em AGPI ómega-3 no retorno à atividade lútea e na fertilidade no pós-parto em bovinos leiteiros

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2024

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 15 de novembro de 2024

Assinatura: Inês Gonçalves Faustino Duarte

## **Agradecimentos**

Quero agradecer à minha família por todo o apoio e carinho. Em primeiro lugar ao meu tio, sem o qual não teria conseguido chegar onde estou hoje e por ter sido, sem sombra de dúvida, a peça fulcral no meu percurso académico. À minha avó, por ter estado sempre presente e, mesmo sem entender os desafios e frustrações que o curso colocava, me apoiou ao longo de todo o caminho. À minha irmã, pela amizade e paciência. À minha tia, que sempre me apoiou incondicionalmente e a qual trago no meu coração em tudo o que sou e faço.

Ao Tiago, por ser o meu grande e indispensável apoio.

Ao Professor Doutor Ricardo Bexiga, por toda a ajuda que disponibilizou para a realização desta dissertação, pela preocupação e por todo o apoio demonstrado nesta etapa final.

Ao Doutor Gonçalo Pereira por toda a ajuda e tempo disponibilizados.

Aos Dr. Dário Guerreiro e Dr. André Parada, por tudo o que me ensinaram, mas também pelo enorme companheirismo, amizade e boa disposição sempre demonstradas ao longo do estágio.

Ao Dr. Eleutério Valente, por ter apostado em mim desde o início do curso e me ter ensinado imenso, sempre com paciência e dedicação.

À família e equipa Barão & Barão pelo carinho com que me receberam e em especial ao Dr. Pedro Castro por tudo o que me ensinou.

Ao Professor Doutor João Nestor, por todos os ensinamentos transmitidos, mas também pela grande amizade e preocupação que sempre demonstrou.

À Cristina Barros por toda a ajuda e apoio que me deu.

A todos os meus amigos e em especial aos que a FMV me trouxe, sem os quais o percurso não teria sido o mesmo, e que fizeram com que tudo valesse a pena! Um agradecimento especial às minhas amigas Juliana, Mariana, Rita, Cláudia, Lebre e Jéssica. Obrigada por terem tornado esta experiência memorável!

# INFLUÊNCIA DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR RICO EM AGPI ÔMEGA-3 NO RETORNO À ATIVIDADE LÚTEA E NA FERTILIDADE NO PÓS-PARTO EM BOVINOS LEITEIROS

## RESUMO

Durante o período de transição, a vaca leiteira de alta produção torna-se incapaz de suprir as exigências energéticas do feto em rápido crescimento e do início da produção leiteira, enquanto a ingestão de matéria seca diminui, o que faz com que entre em balanço energético negativo. Este estado catabólico, em conjunto com as alterações inflamatórias verificadas durante o período de involução uterina, afetam negativamente a função reprodutiva destes animais e por consequência diminuem a sua rentabilidade. A suplementação alimentar, nomeadamente através do fornecimento de ácidos gordos essenciais na dieta, pode ultrapassar estes desafios. O objetivo deste trabalho é o de determinar a influência do fornecimento de um suplemento alimentar rico em AGPI (Ácidos Gordos Polinsaturados) ómega-3 em diferentes aspetos relacionados com o retorno à ciclicidade ovárica no pós-parto e na fertilidade de vacas leiteiras, numa exploração de alta produção. Aos 11 dias pós-parto foram selecionados 60 animais e aleatoriamente distribuídos por dois grupos. O grupo ómega-3 (n=29), suplementado com óleo de linhaça encapsulado e o grupo controlo (n=31), que recebeu um suplemento isoenergético constituído por óleo de palma hidrogenado. A suplementação da dieta dos dois grupos foi feita através dum sistema de distribuição automático de alimento e teve a duração de 9 semanas. A ingestão da dieta rica em AGPI n-3 não afetou os parâmetros metabólicos medidos (avaliação da condição corporal, medição de ácidos gordos não esterificados e de  $\beta$ -hidroxibutirato no sangue) nem teve influência no tempo decorrido até à primeira ovulação a seguir ao parto. A taxa de concepção à primeira inseminação artificial foi afetada pela quantidade de suplemento ingerido, em ambos os grupos. Verificou-se uma diminuição do intervalo parto-concepção no grupo n-3. Desse modo, o estudo permitiu analisar a influência da suplementação da dieta com AGPI ómega-3 na fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. No entanto, ficou limitado pela discrepância verificada na ingestão de suplemento nos dois grupos e pela existência de diversas variáveis que não ofereceram resultados estatisticamente significativos.

**Palavras-Chave:** vaca leiteira, ácidos gordos polinsaturados n-3, ciclicidade ovárica, pós-parto, fertilidade

# INFLUENCE OF FEEDING OMEGA-3 PUFA RICH DIETARY SUPPLEMENT ON RESUMPTION OF POSTPARTUM LUTEAL ACTIVITY AND IN FERTILITY IN DAIRY COWS

## ABSTRACT

During the transition period the high-producing dairy cow becomes unable to meet the energy demands of the rapidly growing fetus and milk production while dry matter intake decreases leading to a negative energy balance. This catabolic state, along with the inflammatory changes that occur during the uterine involution period, negatively affect the reproductive function of these animals consequently reducing their productivity. Nutritional supplementation particularly through the provision of essential fatty acids in the diet aims to overcome these challenges. This study aimed to determine the influence of providing an omega-3 PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) rich dietary supplement on various aspects related to the resumption of ovarian cyclicity in the postpartum period and the fertility of high-producing dairy cows. At 11 days postpartum, 60 animals were selected and randomly assigned to two groups. The omega-3 group (n=29) was supplemented with encapsulated linseed oil and the control group (n=31) received an isoenergetic supplement made of hydrogenated palm oil. The diet supplementation of both groups was delivered through an automated feeding system and lasted 9 weeks. The intake of the n-3 PUFA rich diet did not affect the measured metabolic parameters (body condition score, measurement of non-esterified fatty acids and blood  $\beta$ -hydroxybutyrate) nor did it influence the time to first ovulation after calving. Conception rate at first artificial insemination was affected by the amount of supplement consumed in both groups. A reduction in the calving-to-conception interval was observed in the n-3 group. This study allowed to observe the influence of diet supplementation with omega-3 PUFA on the fertility of high-producing dairy cows. However, a main limitation was the discrepancies in supplement intake in the two groups and several variables did not yield statistically significant results.

**Keywords:** dairy cow, n-3 PUFA, ovarian cyclicity, postpartum, fertility

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>Lista de Gráficos</b> .....	ix
<b>Lista de Tabelas</b> .....	x
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xi
<b>Lista de Aparelhos</b> .....	xii
<b>1. Descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular</b> .....	1
<b>2. Introdução</b> .....	4
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	4
<b>3.1. Puerpério</b> .....	4
<b>3.1.1. Alterações uterinas no pós-parto</b> .....	4
<b>3.1.2. Retorno à ciclicidade ovárica no pós-parto</b> .....	6
<b>3.1.3. Fertilidade da vaca leiteira de alta produção</b> .....	9
<b>3.1.4. Alterações metabólicas no pós-parto</b> .....	10
<b>3.1.4.1. Cetose</b> .....	12
<b>3.1.4.2. Avaliação da condição corporal</b> .....	12
<b>3.1.5. Doenças uterinas do pós-parto</b> .....	13
<b>3.1.5.1. Endometrite</b> .....	14
<b>3.2. Ácidos gordos polinsaturados n-3</b> .....	17
<b>3.2.1. Fonte natural de AGPI n-3</b> .....	17
<b>3.2.2. Mecanismo através do qual ocorre o aproveitamento pela vaca</b> .....	18
<b>3.2.3. Suplementação de AGPI n-3 e a sua influência na reprodução</b> .....	18
<b>4. Objetivo</b> .....	19
<b>5. Material e métodos</b> .....	19
<b>5.1. Desenho experimental</b> .....	19
<b>5.2. Alimentação</b> .....	20
<b>5.3. Amostras de sangue</b> .....	21
<b>5.4. Análise das concentrações de progesterona</b> .....	21
<b>5.5. Condição corporal e indicadores de balanço energético</b> .....	22
<b>5.6. Avaliação do trato genital e citologia endometrial</b> .....	22
<b>5.7. Maneio reprodutivo</b> .....	23
<b>5.8. Recolha de informação</b> .....	23
<b>5.9. Análise estatística</b> .....	24

<b>6. Resultados</b> .....	25
<b>6.1. Intervalo entre o parto e a primeira ovulação pós-parto</b> .....	25
<b>6.2. Taxa de concepção e intervalo parto-concepção</b> .....	28
<b>7. Discussão</b> .....	29
<b>7.1. Intervalo entre o parto e a primeira ovulação pós-parto</b> .....	30
<b>7.1.1. BEN e a sua influência no retorno à ciclicidade no pós-parto</b> .....	30
<b>7.1.1.1. Número de partos no retorno à ciclicidade</b> .....	31
<b>7.1.1.2. Condição corporal</b> .....	32
<b>7.1.1.3. Produção leiteira e BEN</b> .....	33
<b>7.1.2. Endometrite e retorno à atividade lútea no pós-parto</b> .....	34
<b>7.2. Análise da fertilidade do grupo de animais em estudo</b> .....	34
<b>7.2.1. Taxa de concepção à 1ª IA e suplementação da dieta com linhaça</b> .....	35
<b>7.2.2. Intervalo parto-concepção</b> .....	36
<b>8. Conclusão</b> .....	36
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	38
<b>Anexos</b> .....	47

## **Lista de Figuras**

<u>Figura 1 - Desenho experimental (CC - condição corporal; SPP - semanas pós-parto). Esquema adaptado de Pereira et al. 2022</u> .....	20
<u>Figura 2 - Alimentador automático que fez a distribuição dos suplementos</u> .....	21
<u>Figura 3 - Escova adaptada à extremidade de um estilete de inseminação artificial, utilizada para recolha das amostras para citologia (<i>cytobrush</i>)</u> .....	23

## **Lista de Gráficos**

<u>Gráfico 1 - <i>Boxplot</i> da quantidade de suplemento ingerido (em kg) por cada animal, em cada um dos grupos .....</u>	26
<u>Gráfico 2 - Curvas de Kaplan Meyer, onde se comparam dois grupos de animais, com e sem endometrite, e o tempo, em dias, que decorre até à primeira ovulação pós-parto (DPP, dias pós-parto; P4, progesterona) .....</u>	28
<u>Gráfico 3 - Curvas de Kaplan Meyer onde se comparam dois grupos de animais, primíparas e multíparas, e o tempo, em dias, que decorre entre o parto e a concepção .....</u>	29

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos valores das medições de AGNE e de BHB (em mmol/L) nos dois grupos..... 26

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de condição corporal nos dois grupos 27

## **Lista de Abreviaturas**

AG – Ácidos Gordos

AGNE – Ácidos Gordos Não Esterificados

AGPI – Ácidos Gordos Polinsaturados

ALA – Ácido  $\alpha$ -linolénico

BHB –  $\beta$ -hidroxibutirato

CC – Condição Corporal

CL – Corpo Lúteo

DHA – Ácido Docosahexaenoico

DPP – Dias Pós-Parto

EPA – Ácido Eicosapentaenoico

FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

GnRH – Gonadoliberina

IA – Inseminação Artificial

IGF-1 – Fator de crescimento insulínico tipo 1

IMS – Ingestão de Matéria Seca

IPC – Intervalo Parto-Concepção

LH – Hormona Luteinizante

MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

OV – Ovulação

P4 – Progesterona

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$

PMN – Neutrófilos Polimorfonucleares

SNC – Sistema Nervoso Central

SPP – Semanas Pós-Parto

TMR – Dieta Completa

## **Lista de Aparelhos**

*DairyFeed C-8000®*, *GEA Farm Technologies* – distribuidor automático de alimento

*IMMULITE 1000*, *Siemens Healthcare Diagnostics* – medidor de progesterona

*Precision Xtra*, *Abbott Diabetes Care* – medidor portátil usado para a determinação dos valores sanguíneos de BHB

*Kit no. FA 115*, *Randox RX Daytona equipment* – kit usado na análise colorimétrica das concentrações sanguíneas de AGNE

Tubo nº13060, *KIMA Vacutest®* - tubos com EDTA tripotássico utilizados na recolha de sangue

## **1. Descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular**

### **Estágio curricular**

O estágio curricular do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) foi realizado na empresa Sá Guerreiro Vet, Lda., sob a tutoria do Dr. Dário Guerreiro, entre os dias 23 de novembro de 2020 e 30 de abril de 2021, perfazendo um total de cinco meses. Esta empresa presta serviços em ambulatório nas áreas de clínica, sanidade, reprodução e consultoria com maior expressão na espécie bovina, mas também apresenta casuística nas espécies de pequenos ruminantes, suínos, equinos e animais de companhia.

Durante o estágio curricular na Sá Guerreiro Vet foi possível acompanhar os veterinários Dr. Dário Guerreiro e Dr. André Parada em diversas ações nas áreas de clínica, cirurgia, reprodução e de sanidade animal. A área de atuação abrangia a região da Península de Setúbal, Alentejo e Ribatejo.

No âmbito da sanidade animal foram realizadas várias desparasitações e vacinações bem como saneamentos e testes de pré-movimentação de bovinos em conjunto com os Serviços de Sanidade Animal (ADS/OPP) da Península de Setúbal e de outras regiões. Na área de clínica foram acompanhados diferentes casos clínicos com a possibilidade de realização de exames físicos, discussão de diagnósticos diferenciais e prestação de tratamentos.

Abordaram-se doenças gastrointestinais - diarreias neonatais, timpanismo, acidose, parasitoses; respiratórias; neurológicas; musculoesqueléticas; cardíacas; podais; oculares; doenças metabólicas - toxémia de gestação, cetose; doenças infecciosas – leptospirose, queratoconjuntivite infecciosa, agaláxia contagiosa. Houve também a possibilidade da realização de várias necrópsias em pequenos e grandes ruminantes.

Foi possível auxiliar atos cirúrgicos como piloropexia em deslocamentos de abomaso à esquerda e à direita, cesarianas, correção de prolapsos uterinos e vaginais, orquiectomias e descornas. Foram também acompanhados tratamentos de feridas e drenagem de abscessos.

Na área da reprodução foram realizados diagnósticos de gestação em bovinos de leite e de carne através de palpação retal e de ecografia transretal, diagnóstico e tratamento de doenças reprodutivas (retenções placentárias, metrites, endometrites), exames andrológicos e foi prestada assistência em partos distócicos de grandes e pequenos ruminantes.

## **Estágios extracurriculares**

Antes do início do estágio curricular foi realizado um estágio extracurricular na empresa TopVet-Serviços de Veterinária, Lda. durante o mês de outubro de 2020.

Durante este mês foi possível acompanhar o Dr. Eleutério Valente no seu dia a dia como veterinário de espécies pecuárias. A prática realizada em ambulatório tinha como área de atuação a região do Baixo Alentejo, principalmente na zona de Moura, cobrindo também as zonas de Barrancos, Amareleja e Vila Verde de Ficalho. Foi acompanhada a realização de diferentes ações na área de clínica, cirurgia, reprodução e de sanidade animal. Foi possível realizar exames físicos e auxiliar na realização de algumas cirurgias como cesarianas e prolapsos uterinos. Foi possível auxiliar o saneamento, desparasitação e vacinação de ovinos, caprinos, bovinos e suínos e acompanhar uma avaliação sanitária de caça maior. Permitiu acompanhar o diagnóstico e tratamento de algumas doenças destes animais e auxiliar alguns procedimentos na área da reprodução de ruminantes, tais como partos e diagnósticos de gestação em bovinos de carne e diagnósticos de gestação em ovinos.

Posteriormente foi realizado um estágio na exploração Barão & Barão, Lda. o qual teve uma duração de 3 meses, entre 1 de novembro de 2021 e 31 de janeiro de 2022.

Durante este tempo foi possível assistir o veterinário responsável da exploração, o Dr. Pedro Castro, nas mais diversas atividades diárias da exploração. A exploração Barão & Barão, à data do estágio, possuía um efetivo de 550 vacas leiteiras da raça Holstein-Frísia e 1500 caprinos leiteiros das raças Alpina e Saanen. Pertencentes à mesma exploração, mas numa localização distinta, a Barão & Barão possuía vacas de aptidão cárnica com um efetivo de cerca de 850 animais maioritariamente de raça Limousine. Aqui foi possível acompanhar a rotina diária de uma exploração leiteira em regime intensivo e o maneio efetuado ao nível da alimentação, ordenha e reprodução animal. Na área de clínica de espécies pecuárias a autora auxiliava no diagnóstico e tratamento de retenções placentárias, metrites, cetoses, hipocalcemias, mastites, patologias podais, pneumonias, diarreias neonatais, entre outras. Prestava auxílio no diagnóstico de deslocamentos de abomaso, bem como a preparação e realização da cirurgia para a resolução dos mesmos. Na área de reprodução foi possível seguir e auxiliar a aplicação de protocolos reprodutivos em bovinos de leite e de carne e os diagnósticos de gestação em bovinos de leite, bovinos de carne e caprinos. Realizava a vacinação e desparasitação de bovinos e caprinos e a aplicação de *kits* de identificação oficial em caprinos. Efetuava a recolha de sangue em vitelos para a

medição de proteínas totais e auxiliava na descorna de vitelos de leite. Houve ainda a possibilidade de realizar várias necrópsias em vitelos, vacas e cabras.

Houve oportunidade de acompanhar o Professor Doutor João Nestor nos seus serviços prestados pela FMV-UL aos produtores, na área de reprodução, durante os meses de maio e junho de 2021 e posteriormente entre setembro de 2021 e outubro de 2022. As atividades realizadas neste âmbito foram: diagnósticos de gestação por palpação retal e ecografia transretal; exames andrológicos em grandes e pequenos ruminantes; recolha e congelação de sémen em bovinos e ovinos; implementação de protocolos de Inseminação Artificial a Tempo Fixo (IATF) em bovinos e ovinos; seleção de fêmeas recetoras de embriões; recolha, avaliação e transferência ou congelação de embriões de bovinos e de ovinos. Foi ainda possível observar e auxiliar as técnicas de inseminação e de recolha de embriões por laparoscopia em ovinos e assistir à técnica de foliculocentese ecoguiada (OPU-Ovum Pick-Up) em bovinos.

## **2. Introdução**

A vaca leiteira de alta produção tem evoluído de forma a poder suprir as crescentes necessidades de produção de leite que a sociedade atual exige. Esta melhoria produtiva tem provocado um declínio gradual e progressivo na eficácia reprodutiva destes animais em várias explorações em todo o mundo. Nas últimas décadas, a seleção genética para uma alta produção leiteira, juntamente com manejos nutricionais inadequados, contribuíram para a redução da fertilidade que se verifica atualmente na indústria leiteira (Otto et al. 2014). Nos últimos anos têm sido estudadas estratégias de suplementação alimentar que visam ultrapassar estes desafios, nomeadamente através do fornecimento de ácidos gordos essenciais na dieta.

A presente dissertação de mestrado surge no âmbito do projeto “Natomega” desenvolvido pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da FMV-ULisboa e do qual resultou o artigo científico “*Effects of feeding rumen-protected linseed fat to postpartum dairy cows on plasma n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations and metabolic and reproductive parameters*” publicado em 2022 no *Journal of Dairy Science* (Pereira et al. 2022).

O presente trabalho propõe estudar a influência da suplementação da dieta com ácidos gordos ómega-3, em diferentes aspetos relacionados com o retorno à ciclicidade ovárica no pós-parto e com a fertilidade de vacas leiteiras, numa exploração de alta produção.

## **3. Revisão Bibliográfica**

### **3.1. Puerpério**

O puerpério é o período correspondente ao retorno do aparelho genital ao seu estado não gravídico, após a conclusão do parto. Em muitos sistemas de produção de animais poliéstricos não sazonais, como é o caso dos bovinos leiteiros, os animais são selecionados para entrada à reprodução pouco tempo depois do parto, tornando o puerpério um dos períodos mais importantes do pós-parto (Noakes 2019). Quanto maior for a duração do puerpério, maior será o intervalo entre o parto e o início de uma nova gestação, tornando o processo de produção menos eficiente (Senger 2012).

#### **3.1.1. Alterações uterinas no pós-parto**

Após o parto e para que se possa estabelecer uma nova gestação, têm de ocorrer, concomitantemente, quatro eventos: 1) involução uterina; 2) regeneração do

endométrio; 3) retorno à função ovárica normal e à atividade cíclica; 4) eliminação da contaminação bacteriana do lúmen uterino (Sheldon 2004).

A involução uterina define-se como a redução no tamanho do aparelho genital. Ocorre de acordo com uma escala logarítmica decrescente e as principais mudanças verificam-se nos primeiros dias a seguir ao parto. Durante esta fase os órgãos do aparelho reprodutivo atrofiam, principalmente o útero, como resultado da perda de tecido e de fluidos. Estes são expulsos com a ajuda de contrações do miométrio que, embora diminuam gradualmente em regularidade, frequência, amplitude e duração, prolongam-se vários dias após o parto. Vários fatores influenciam a duração desta fase do puerpério: 1) Número de partos: existe evidência de que a involução ocorre mais rapidamente em primíparas do que em múltiparas; 2) Clima e época do ano; 3) Doenças do periparto: partos distócicos, hipocalcemia, retenção placentária, cetose e metrite, aumentam o tempo necessário para que ocorra a involução do corno pré-gravídico (Noakes 2019).

A recuperação do epitélio endometrial ocorre rapidamente após o parto, estando as áreas intercarunculares completamente regeneradas aos 8 dias pós-parto (DPP) e a reepitelização das carúnculas a partir dos 25 DPP, a qual deriva principalmente do crescimento centrípeto de células provenientes de glândulas uterinas circundantes (Noakes 2019). O processo é considerado completo quando ambos os cornos uterinos se encontram na sua localização normal no pavimento pélvico e apresentam tamanho semelhante ao tamanho não grávido, com tonicidade e consistência consideradas normais (Gohar et al. 2018). O processo de involução uterina é assim um ponto crítico no ciclo produtivo da vaca, e que deve decorrer dentro dos intervalos descritos de modo a não atrasar a concepção seguinte e prejudicar a rentabilidade do animal (Bajcsy et al. 2005).

A contaminação bacteriana do lúmen uterino ocorre na generalidade das vacas e é mais elevada durante os primeiros 20 a 30 DPP, após os quais sofre uma subsequente descida acentuada até à recuperação da sua microbiota normal, por volta das 6 a 8 semanas após o parto (SPP). A eliminação das bactérias contaminantes é feita localmente por leucócitos através da fagocitose e da libertação de mediadores pró-inflamatórios (ex. fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucinas). Foi demonstrado que um rápido retorno à ciclicidade no pós-parto tem influência na eliminação bacteriana através do aumento das concentrações de estrogénios. No entanto, existe evidência de que o primeiro ciclo éstrico pode ser prejudicial caso a contaminação uterina não esteja

resolvida quando o animal entrar na fase lútea, devido à atividade imunossupressora da progesterona, a hormona dominante durante esta fase do ciclo (Noakes 2019).

Quando a eliminação destas bactérias é incompleta desenvolve-se metrite que poderá evoluir para endometrite. Alguns dos fatores que influenciam a eliminação bacteriana são: a magnitude da contaminação que, se muito elevada, poderá sobrecarregar os mecanismos de defesa naturais; a composição bacteriana; atraso na involução uterina; retenção placentária e trauma uterino provocado pelo parto. No entanto, é importante diferenciar contaminação de infecção uterina, isto porque o útero está normalmente contaminado com diferentes espécies bacterianas neste período sem haver sinais clínicos (Sheldon et al. 2006).

### **3.1.2. Retorno à ciclicidade ovárica no pós-parto**

Os fatores que influenciam o retorno à ciclicidade incluem:

a) Produção leiteira - a literatura disponível não é unânime, uma vez que frequentemente se torna difícil a distinção dos efeitos causados pela produção de leite vs. a nutrição do animal;

b) Nutrição - as deficiências energéticas, durante o período seco e após o parto, inibem o retorno à ciclicidade ovárica;

c) Número de partos - a maior parte dos estudos apresenta um atraso no retorno à ciclicidade em primíparas. Novamente a influência da nutrição, condição corporal (CC) e produção leiteira, tornam difícil estabelecer a causalidade. No geral, vacas em lactação tendem a apresentar concentrações sanguíneas de progesterona mais baixas durante o ciclo éstrico quando comparadas com novilhas, o que permite um aumento ligeiro na frequência dos pulsos de LH e um crescimento prolongado de cada folículo dominante (em oposição à rápida atresia folicular que se verifica nas primeiras ondas foliculares de novilhas) (Crowe et al. 2014);

d) Estação do ano e clima – assume-se como facto que o fotoperíodo tem efeito no retorno à ciclicidade, havendo um aumento do período acíclico nos dias curtos, embora menos evidente e com menor influência nas vacas leiteiras (Noakes 2019).

Durante os dois primeiros trimestres da gestação verifica-se a contínua ocorrência de ondas foliculares anovulatórias em intervalos regulares de 7 a 10 dias, com a emergência folicular e desenvolvimento de folículos até um diâmetro de 6 mm. No final da gestação (aproximadamente durante os últimos 22 dias) o forte *feedback* negativo exercido pela progesterona (produzida pelo corpo lúteo (CL) e placenta) e pelos estrogénios (produzidos maioritariamente pela placenta) suprime os aumentos

recorrentes de FSH (responsáveis por estimular o crescimento folicular), tornando os ovários quiescentes (Crowe 2008).

Na altura do parto a hipófise está refratária à GnRH devido ao contínuo feedback negativo exercido pelas altas concentrações de hormonas esteroides que ocorre durante a gestação (Lamming et al. 1979). O parto leva à remoção dos efeitos do feedback negativo exercido pelos estrogénios e progesterona sobre o eixo hipotálamo-hipófise, o que permite restabelecer a libertação pulsátil de GnRH, a qual vai atuar na hipófise para restaurar o padrão normal de libertação da FSH (Ambrose 2021). A FSH retoma os seus valores normais dentro de 5 DPP desencadeando a emergência de uma onda folicular (Crowe et al. 1998).

Entre os 7 e 14 DPP ocorre um aumento das concentrações de FSH, associado à emergência da primeira onda folicular pós-parto. Nesta fase do ciclo, a produção de estrogénio e inibina pelos folículos em crescimento provoca uma supressão da secreção de FSH. O folículo com maior diâmetro desenvolve recetores para a LH e proteases para as proteínas de ligação da IGF-1. Estas proteases degradam as proteínas de ligação da IGF-1, mantendo altos os níveis de IGF-1 bioativa (Roche 2006). A diminuição nas concentrações sistémicas de FSH irá suprimir o desenvolvimento de outros folículos presentes no ovário, mas o folículo dominante continua o seu crescimento devido ao aumento nos seus recetores para a LH. Nesta fase o destino do folículo dominante passa a estar dependente da frequência dos pulsos de LH. De acordo com Roche (2006), ocorre uma das seguintes situações: ovulação (OV) do folículo dominante (em 30 a 80% das vacas); o folículo dominante sofre atresia (15 a 60%); o folículo dominante transforma-se em quisto (1 a 5%). A ovulação é dependente:

a) Do tamanho do folículo dominante - folículos com diâmetro inferior a 10 mm raramente ovulam;

b) Da frequência dos pulsos de LH - para que ocorra a ovulação a frequência dos pulsos de LH deve ser de 1 pulso por hora;

c) Da concentração de IGF-1 - a IGF-1 estimula a atividade da aromatase das células da granulosa e com ela a síntese de estrogénio. Por sua vez o estrogénio exerce um efeito de feedback positivo no pico pré-ovulatório de LH (Noakes 2019).

À volta das 3 SPP a função da hipófise e as quantidades de LH estão restauradas. A normal pulsatilidade da LH permite o estabelecimento de folículos dominantes capazes de produzir quantidades maiores de estrogénios. Este aumento da concentração de estrogénio é essencial para desencadear o pico de LH que

desencadeia a primeira ovulação. Apesar da primeira ovulação sinalizar o retorno à ciclicidade no pós-parto, nem todos os animais irão retomar ciclos éstricos normais após a primeira ovulação (Ambrose 2021).

A fase lútea que se segue à primeira ovulação poderá ter uma duração normal - com um novo estro daí a 18-24 dias - ou poderá ser curta - inferior a 14 dias. A curta duração da fase lútea poderá dever-se à libertação prematura de PGF2 $\alpha$  resultante do aumento de estrogénios produzidos pelo folículo dominante pós-ovulatório (entre os dias 5 a 8 do ciclo éstrico) (Roche 2006), com uma prevalência de 25% em vacas leiteiras (Adams 1999). A maior parte das ovulações do primeiro folículo dominante são silenciosas, ou seja, não são acompanhadas de sinais de estro. Isto acontece porque o Sistema Nervoso Central (SNC) requer uma exposição prévia à progesterona para que haja demonstração de cio pelo animal (Noakes 2019).

O CL regride prematuramente (à volta dos 8-10 dias após a primeira ovulação) e a segunda ovulação irá ocorrer 9 a 11 dias após a primeira ovulação. Esta segunda ovulação está normalmente associada à expressão de sinais de cio e é seguida por uma fase lútea de duração normal com produção de quantidades normais de progesterona (Crowe et al. 1998). Animais cíclicos poderão desenvolver entre duas e quatro ondas foliculares durante os ciclos éstricos que se seguem ao parto. A vaca leiteira apresenta ciclos éstricos de duração entre 18 e 24 dias, sendo mais comum um desenvolvimento de duas ondas foliculares por ciclo. As concentrações de progesterona no sangue são a principal condicionante da frequência dos pulsos de LH em animais cíclicos e, por isso, a sua análise torna-se importante aquando do estudo do retorno à ciclicidade ovárica destes animais durante o período do pós-parto (Crowe et al. 2014). Há mais de quatro décadas que a P4 é usada para monitorizar a atividade ovárica e como auxiliar na deteção do estro e da gestação em vacas leiteiras (Colazo et al. 2008).

De acordo com Colazo et al. (2008), pode admitir-se que o retorno à ciclicidade ocorre quando as concentrações de P4 no plasma sanguíneo de bovinos leiteiros são  $\geq 1$  ng/mL, uma vez que estas indicam a existência de um CL funcional. Também Martin et al. (2007) interpretam uma concentração de progesterona superior a 1 ng/mL como indicativa de atividade lútea. Por sua vez concentrações  $< 1$  ng/mL indicam a ausência de CL ou de ciclicidade.

### **3.1.3. Fertilidade da vaca leiteira de alta produção**

Durante as últimas décadas, um rápido e contínuo progresso genético na produção leiteira, em conjunto com a gestão nutricional de vacas leiteiras de alta produção, levou ao antagonismo entre a alta produção de leite e a fertilidade, afetando negativamente a eficácia reprodutiva das explorações leiteiras (Moore and Thatcher 2006)

Num esforço para aumentar a eficácia e produtividade animal, cada fêmea deve ser inseminada e ficar gestante durante o período de produção leiteira. Assim, gestação e lactação sobrepõem-se no tempo até ao início do período seco, antes do parto e da nova lactação (Lucy 2001).

Para que uma vaca tenha um intervalo entre partos considerado ótimo - 13 meses - é necessário que fique gestante nos primeiros 3 meses após o parto. Isto requer um retorno à ciclicidade ovárica normal em poucas semanas após o parto. Alguns estudos reportaram o atraso no reinício da atividade ovárica como uma das causas do comprometimento no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (Gautam et al. 2010).

Nos bovinos leiteiros, o anestro pós-parto é definido como uma condição na qual as fêmeas não demonstram sinais de estro durante várias semanas após o parto, normalmente até perto do final do período voluntário de espera. Embora um curto período de inatividade ovárica logo após o parto seja considerado normal, o seu prolongamento pode ter repercussões negativas no restabelecimento da ciclicidade ovárica, o que por consequência irá aumentar o intervalo parto-concepção (IPC) (Ambrose 2021). Uma precoce ocorrência e deteção do estro são essenciais para que os animais fiquem gestantes e se mantenha um intervalo entre partos aceitável (Thatcher and Wilcox 1973).

A duração do anestro pós-parto exerce uma importante influência na performance reprodutiva. Tem sido sugerido que em explorações com altas produções de leite a incidência de anestro é maior. Talvez um aumento na repartição de energia para a produção de leite possa aumentar o anestro pós-parto por atrasar o retorno da atividade folicular. No entanto, fatores como a limitação na quantidade de energia ingerida, baixas reservas corporais e doenças do pós-parto também podem atrasar o retorno à ciclicidade. Por outro lado, um parto sem complicações permite um retorno imediato à atividade ovárica cíclica (Peter et al. 2009).

Há muitas décadas que o anestro pós-parto é reconhecido como um problema importante (Short et al. 1990), tendo sido reportado pela primeira vez como um problema reprodutivo na década de 1920. A prevalência do anestro pós-parto é específica de cada exploração e varia amplamente entre vacadas. Ainda assim, sabe-se que existe uma

variação entre 10% e 30% nas taxas de prevalência de anestro pós-parto, no final do período voluntário de espera (~60 a 80 DPP) (Ambrose 2021).

A fertilidade em vacas leiteiras é afetada pela influência cumulativa de vários fatores metabólicos, endócrinos e de saúde no pós-parto que têm vindo a ser modificados pela crescente seleção genética para a alta produção leiteira (Butler 2003). Uma exploração leiteira moderna é um sistema complexo. A produtividade e rentabilidade ótimas estão dependentes da interação entre genética, nutrição, saúde, ambiente, reprodução e manejo (McNamara e Shields 2013). Para que a exploração se mantenha rentável é desejável manter os animais na zona de maior produção leiteira da curva de lactação e conseguir que retornem a esse ponto o mais rapidamente possível, permitindo assim maximizar o número de lactações durante a vida útil de cada vaca. De maneira a maximizar a eficiência reprodutiva de uma exploração leiteira, os animais devem ficar gestantes assim que possível após o início do período de reprodução. A performance reprodutiva é avaliada através de vários indicadores, por exemplo: intervalo parto – primeira IA; intervalo entre partos; intervalo parto – concepção; taxa de detecção de cio; taxa de gestação – percentagem de vacas que ficam gestantes de entre todos os animais elegíveis a serem inseminados; taxa de concepção - percentagem de vacas que ficam gestantes, de entre as que foram inseminadas; taxa de concepção à 1ª IA. Este último foi desenhado para selecionar animais que entram à reprodução mais cedo. Animais que ficam gestantes mais cedo também parem mais cedo e geram produções de leite maiores (Hansen 2021).

#### **3.1.4. Alterações metabólicas no pós-parto**

Logo após o parto as necessidades energéticas da vaca em lactação aumentam drasticamente devido aos grandes requisitos energéticos da produção leiteira, impelindo o animal para um estado catabólico. O balanço energético é o resultado da ingestão energética menos a energia despendida para manutenção, crescimento e produção leiteira. A vaca torna-se incapaz de suprir a demanda energética durante o periparto, quando a ingestão de matéria seca (IMS) é menor e as exigências energéticas causadas pelo feto em rápido crescimento e pelo início da produção leiteira são muito elevadas. Isto leva à utilização das reservas energéticas e à perda de CC pelo que, o animal entra inevitavelmente em balanço energético negativo (BEN) (Pohler et al. 2021). Para contrabalançar o BEN a vaca leiteira recorre à mobilização de tecido adiposo, o que provoca um aumento da concentração plasmática de ácidos gordos não esterificados (AGNE) (Sordillo et al. 2009). Estes ácidos gordos são metabolizados pelos tecidos com o intuito de fornecer energia às células, mas a sua produção em excesso faz com que

sejam incompletamente oxidados e se produzam corpos cetônicos (principalmente  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB)) (Smith 2021). A avaliação do estado energético da vaca pode ser feita através da medição dos valores de AGNE no sangue. Com a aproximação do parto os valores aumentam e atingem o pico no dia do parto (0,8 a 1,2 mmol/L), após o que, diminuem para aproximadamente 0,3 mmol/L às 6 SPP. Valores superiores a 0,7 mmol/L a seguir ao parto são indicativos de um BEN grave (Adewuyi et al. 2005).

A capacidade de armazenamento pelo rúmen é um dos fatores que limita a IMS no início do pós-parto de vacas leiteiras. Mesmo que a IMS seja máxima, uma vaca alta produtora de leite direciona todos os nutrientes disponíveis para a produção leiteira, à custa da sua CC (Bauman and Currie 1980). Mesmo com todos os avanços que têm sido feitos nos últimos anos na compreensão da nutrição da vaca leiteira e na criação de softwares de formulação alimentar de alta precisão, alcançar as necessidades energéticas da vaca leiteira de alta produção continua a ser um desafio e os animais continuam a entrar num estado de BEN que se estende por 10-12 SPP (Butler 2003). Animais em BEN têm baixas concentrações sanguíneas de insulina e de IGF-1. As baixas concentrações de IGF-1 deixam de exercer *feedback* negativo na hormona do crescimento (GH) levando ao aumento das concentrações de GH. A GH por sua vez aumenta a gluconeogénese hepática e promove a lipólise, o que leva à libertação de AGNE (Ambrose 2021). Níveis baixos de insulina, IGF-1 e glucose, assim como altas concentrações de BHB e AGNE durante o período de BEN, estão associados a alterações na produção de estradiol e a atrasos na primeira ovulação pós-parto (Cheong et al. 2016). Para além disso, a excessiva mobilização de reservas corporais está correlacionada com aumentos de AGNE e de BHB no fluído folicular, o que provoca uma amplificação da apoptose das células circundantes do oócito e impede um desenvolvimento embrionário normal (Pohler et al. 2021).

O BEN atinge o seu pico normalmente 1 a 2 SPP, mas pode prolongar-se durante grande parte da lactação. Alguns artigos já demonstraram os efeitos nocivos do BEN nas taxas de concepção e de mortalidade embrionária (Parkinson 2019). Além disso, sabe-se que está diretamente relacionado com o aumento do intervalo entre o parto e o retorno à ciclicidade, através da influência que exerce no eixo hipotálamo-hipófise, inibindo a libertação de GnRH e alterando o padrão dos pulsos de LH (Butler e Smith 1989; Canfield e Butler 1990). De acordo com Cheong et al. (2016), o BEN é a principal causa da redução da frequência nos pulsos de LH. Esta redução pode ser causada pelo aumento da sensibilidade do hipotálamo aos efeitos do feedback negativo dos estrogénios, diminuindo a libertação de GnRH (Butler et al. 2006).

### **3.1.4.1. Cetose**

A cetose é definida como o aumento dos níveis sanguíneos de corpos cetônicos e ocorre quando a vaca é incapaz de se adaptar ao estado de BEN. Estamos na presença de uma cetose clínica quando se verifica concomitantemente uma descida na produção leiteira, inapetência e prejuízo econômico. Por oposição, a cetose subclínica não é acompanhada de sinais clínicos (Klopfenstein 2019). A cetose subclínica pode ser diagnosticada através da medição de BHB sanguíneo, com um de *cut-off* de 1,2 mmol/L (McArt et al. 2012). O estudo de Walsh et al. (2007), demonstrou que animais com cetose subclínica nas 2 SPP têm uma taxa de fertilidade à 1ª IA diminuída em 20% e que a probabilidade de ficarem gestantes foi reduzida em 50%. Além disso sabe-se que animais com cetose estão mais predispostos ao desenvolvimento de outras doenças do período de transição, como metrite, endometrite, mastite e deslocamento de abomaso (Ospina et al. 2010).

### **3.1.4.2. Avaliação da condição corporal**

A avaliação da CC é feita através da visualização e/ou palpação de certas áreas do corpo do animal. É um método que avalia a quantidade de gordura corporal que a vaca leiteira possui e fornece indicação acerca do estado nutricional do animal. Trata-se de uma avaliação subjetiva e na maior parte dos países é usada uma escala de pontuação de 5 unidades (1 = emaciado; 5 = obeso) com divisões de 0,25 unidades (Atashi et al. 2024). A manutenção de uma CC ideal ao longo da curva de lactação é provavelmente o aspecto mais importante do manejo nutricional de maneira a proporcionar uma transição saudável da gestação para a lactação (Mulligan et al. 2006). A energia ingerida, a CC e a produção leiteira interagem entre si e afetam o balanço energético da vaca leiteira. De acordo com Crowe et al. (2014), os fatores de risco com maior influência no intervalo parto-1ª OV são: perda aguda de CC até aos 60 DPP; cetose clínica; outras doenças com expressão clínica; corrimento vaginal anormal; e distócia. Além da CC ideal ao parto de 2,75 a 3,0, as vacas não devem perder mais de 0,5 unidades de CC entre o parto e o primeiro serviço. Animais que perdem CC em excesso (mais do que 1 unidade de CC) têm um intervalo parto-1ª OV aumentado. Assim, torna-se essencial monitorizar a CC num período alargado para se alcançar um bom manejo reprodutivo.

Em animais altos produtores é essencial prevenir uma perda exagerada de CC e encurtar ao mínimo a duração do BEN no pós-parto. Só assim é possível assegurar a maximização da IMS no pós-parto imediato e uma CC adequada no parto seguinte.

Uma baixa CC resulta numa quiescência do sistema reprodutivo de maneira a preservar o normal funcionamento de sistemas vitais (i.e. SNC, sistema cardiovascular, etc). Uma CC exagerada está normalmente associada a um aumento do intervalo entre o parto e a concepção e com o aumento da percentagem de abortos. Em ambos os casos prolonga-se o tempo que a vaca permanece em lactação e vazia. Isto faz com que estes animais continuem a receber uma dieta com quantidades energéticas mais elevadas do que necessitam para a manutenção, uma vez que a produção leiteira vai diminuindo após atingir o pico e com o avançar da lactação. Vacas que estão obesas (com uma CC > 3,75) no momento do parto têm um risco aumentado de desenvolvimento de doenças metabólicas, de prolongamento do estado de BEN e de atraso na concepção (Cargile and Tracy 2021).

Um dos principais causadores do BEN é uma CC superior a 3,0 no momento do parto, uma vez que provoca uma diminuição do apetite e leva a uma mobilização excessiva de reservas corporais, com consequente perda de CC (superior a 1 unidade de CC) após o parto, ambos com efeitos prejudiciais na fertilidade (Mulligan et al. 2006).

### **3.1.5. Doenças uterinas do pós-parto**

As vacas que desenvolvem doenças uterinas no pós-parto têm um intervalo parto - concepção (IPC) maior e, consequentemente um aumento no intervalo entre partos (IEP). Têm também uma maior probabilidade de serem refugadas, por diminuição da sua produtividade total (Dadarwal e Palmer 2021). No geral, os impactos económicos das doenças uterinas no pós-parto estão relacionados com custos de tratamento, perdas na produção leiteira e fertilidade prejudicada (perdas embrionárias). Infecções uterinas bacterianas não só causam disrupção da função uterina, como também alteram a função ovárica e dos centros de controlo hipotálamo-hipófise (Sheldon e Dobson 2004). As bactérias e mediadores pró-inflamatórios provocam supressão da libertação de LH e inibição da foliculogénese, diminuem a produção de hormonas esteroides, aumentam a incidência de quistos nos ovários e levam ao desenvolvimento de fases lúteas anormais (Crowe et al. 2014).

Atualmente, sabe-se que a predisposição da vaca para o desenvolvimento de doenças uterinas no pós-parto é multifatorial. Além disso, o stress metabólico e as práticas de manejo intensivo a que as vacas altas produtoras de leite estão sujeitas, são muitas vezes referidas como as causas da sua suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de doenças uterinas (Dadarwal e Palmer 2021). É unanimemente aceite que alterações ocorridas durante o parto, tais como aborto, retenção placentária,

parto gemelar, distócia e lacerações traumáticas do canal genital, são fatores de risco para o desenvolvimento de infecções uterinas (Schlafer e Foster 2016). Para além disso, são também fatores de risco modificações que se verificam durante o período de transição: imunossupressão periférica; BEN (perda de CC); e alterações metabólicas (hipocalcemia e cetose). Elas aumentam grandemente a probabilidade de desenvolvimento de doença uterina durante o período do pós-parto (Dadarwal and Palmer 2021). Existem três doenças uterinas que se podem desenvolver durante o período do pós-parto: metrite, piometra e endometrite.

Vacas com metrite apresentam inflamação que envolve todas as camadas que compõem o útero, i.e. endométrio, miométrio e serosa. O endométrio apresenta-se edemaciado, ocorre infiltração por leucócitos e descamação da mucosa. Ao nível do miométrio há formação de edema e degenerescência granulosa das miofibrilas. Na superfície da serosa pode ser evidente a presença de hemorragia e deposição de fibrina (Schlafer e Foster 2016). Metrite é a forma de inflamação uterina mais evidente a nível clínico e ocorre principalmente nas primeiras 2 SPP. Os animais apresentam um corrimento uterino que varia entre vermelho-acastanhado, de consistência aquosa e o branco de consistência viscosa, frequentemente de odor fétido. Recentemente foi proposto um sistema de classificação de metrite em três níveis, com base nos sinais clínicos apresentados (Sheldon 2019). Entre 5 e 20% das vacas leiteiras sofrem metrite no início da lactação (Pascottini and LeBlanc 2020).

As espécies bacterianas mais comumente isoladas em casos de metrite e de endometrite clínica são, na maioria dos casos, *Escherichia coli* e, em menor percentagem, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella spp.*. É provável que a adesão e crescimento precoces (2 DPP) de *E. coli* facilitem a posterior infeção por *F. necrophorum* (8-10 DPP). Além disso, *F. necrophorum* segrega uma leucotoxina que provoca a lise de células do sistema imunitário, potenciando o crescimento desta bactéria e de outras bactérias invasoras, como *Trueperella pyogenes*. Esta sinergia entre diferentes bactérias podem ser uma das razões pelas quais a infeção persiste numa parte dos animais que mais tarde são diagnosticados com endometrite (Dadarwal and Palmer 2021).

### **3.1.5.1. Endometrite**

A endometrite define-se como a inflamação das camadas mucosa e submucosa do útero. Vacas até aos 21 DPP não devem ser diagnosticadas com endometrite, uma vez que podem ser falsamente confundidas com animais em processo normal de

involução uterina (Dadarwal e Palmer 2021). De acordo com o estudo de Gilbert e Santos (2016), que analisou várias citologias uterinas ao longo de 7 SPP, foi possível verificar que a proporção de neutrófilos, relativamente à quantidade total de células, se mantém elevada durante as três primeiras SPP, diminuindo de seguida. Estes achados sugerem que as contagens elevadas de neutrófilos refletem processos inflamatórios fisiológicos associados à remodelação uterina que se encontra a decorrer, apoiando o facto de ser inapropriado o diagnóstico de endometrite antes dos 21 DPP. A endometrite clínica é definida pela presença de corrimento vaginal purulento, detetável na vagina de vacas depois de 21 DPP ou pela presença de corrimento mucopurulento detetável na vagina de vacas depois de 26 DPP (Sheldon et al. 2006). No entanto, é importante ter em conta que alguns animais não exibem descarga vaginal, ou por se encontrarem na fase lútea do ciclo éstrico ou por serem mais eficazes na eliminação da mesma (Dadarwal and Palmer 2021).

### **1. Endometrite subclínica**

Enquanto as doenças clínicas são mais facilmente combatidas quanto melhor for a resposta do sistema imunitário (SI) em limitar os efeitos da carga bacteriana, por sua vez, a ocorrência de endometrite subclínica depende da eficácia em evitar o excesso ou persistência de inflamação (Pascottini and LeBlanc 2020). A endometrite subclínica é a inflamação do endométrio sem presença de sinais clínicos e frequentemente sem evidência de infeção. Pode desenvolver-se como resposta a infeções uterinas não específicas ou pode dever-se ao processo inflamatório prolongado que persiste mesmo após a eliminação bacteriana (Angel et al. 2018). É caracterizada, através da análise de citologias uterinas, pela presença de neutrófilos na superfície do endométrio, em proporções cada vez maiores, e define-se com recurso a limiares estabelecidos de acordo com os dias pós-parto em que o animal se encontra. Pode por isso também ser designada por endometrite citológica.

Vacas com uma involução uterina normal apresentam uma infiltração leucocitária (primariamente neutrófilos) durante a 1ª SPP (> 40% de PMN em citologia aos 7 DPP), ocorrendo posteriormente uma descida na quantidade destas células, devendo ser < 5% à 4ª SPP, até aproximadamente zero, entre a 5ª e a 7ª SPP. Alguns fatores podem predispor os animais ao desenvolvimento de endometrite, tal como uma fraca resposta imunitária a nível da mucosa e a sinergia entre agentes patogénicos uterinos. Vacas com um sistema imunitário mais fraco, o qual se traduz por contagens neutrofílicas mais baixas durante a 1ª SPP, têm um risco de desenvolver endometrite entre a 5ª e a 7ª SPP, maior. No início da lactação a resposta imunitária inata está alterada devido ao

BEN e/ou doenças metabólicas que têm um impacto negativo nas capacidades fagocíticas e oxidativas das células de defesa imunitária (Pascottini and LeBlanc 2020).

Uma baixa IMS e um aumento nas concentrações de AGNE no sangue, durante o período do pós-parto, têm sido associadas à diminuição na funcionalidade das células de defesa imunitária e ao aumento da incidência de animais com endometrite (Dadarwal and Palmer 2021).

### **Diagnóstico de endometrite**

A endometrite clínica pode ser diagnosticada através da observação do conteúdo eliminado através da vagina. Este conteúdo pode estar localizado na zona vulvar ou na zona cranial da vagina. LeBlanc et al. (2002) sugerem que poderá ser benéfico adiar o exame dos exsudados vaginais para 28 a 30 DPP, uma vez que irá diminuir o número de falsos positivos (pertencentes a animais que possuem uma involução uterina normal mais lenta). É importante referir que a presença de um exsudado vaginal mucopurulento pode dever-se a uma endometrite, cervicite ou vaginite ou uma combinação das mesmas. Não obstante, a observação deste tipo de exsudado em vacas aos 28 DPP tem sido consistentemente associada com uma diminuição na taxa de concepção ao primeiro serviço e com um baixo desempenho reprodutivo (Dadarwal and Palmer 2021).

A nível histológico a endometrite é caracterizada pela existência de dano epitelial, infiltração leucocitária, formação de agregados linfóides e, nalguns casos, fibrose das glândulas endometriais (Pascottini et al. 2016). Desde o início dos anos 2000 que vários estudos têm demonstrado a eficácia da citologia uterina como meio de diagnóstico e como exame fundamental para a compreensão da fisiopatologia da endometrite no pós-parto de vacas leiteiras. As amostras para citologia podem ser obtidas através de lavagem uterina de baixo volume, por *cytotape* ou por *cytobrush*. O conteúdo recolhido é depois aposto a lâminas de microscópio, as quais são secas logo de seguida e sujeitas a um processo de coloração. A proporção de neutrófilos é obtida através da contagem do seu número em relação ao número de outros leucócitos e células endometriais. De acordo com Dadarwal e Palmer (2021) o limiar a ser considerado para o diagnóstico de endometrite é de 18% de PMN para amostras recolhidas entre os dias 28 e 35 pós-parto e de 10% para amostras recolhidas após os 35 DPP.

### 3.2. Ácidos gordos polinsaturados n-3

Nos bovinos, os triglicéridos armazenados no tecido adiposo constituem as reservas energéticas do animal. Os mamíferos não conseguem sintetizar ácidos gordos (AG) que contenham ligações duplas mais próximas do grupo terminal metilo que o átomo de carbono 9 e por isso estes têm de ser fornecidos na dieta. Em vacas leiteiras, a carência neste tipo de AG compromete funções essenciais uma vez que estes atuam diretamente em processos fisiológicos como a integridade da membrana celular, regulam a atividade hormonal e a função imunitária. Exemplos deste tipo de AG são o ácido linoleico e o ácido linolénico.

As principais características estruturais dos ácidos gordos ómega-3 (*n*-3) são o comprimento da sua cadeia carbonada e as posições e os números de ligações duplas entre os átomos de carbono. Frequentemente os ácidos gordos polinsaturados (AGPI) são agrupados em famílias de acordo com a posição da sua ligação dupla relativamente ao grupo terminal metilo, em ómega-9, ómega-6 e ómega-3, e cada uma tem como precursor os ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolénico, respetivamente. Certas enzimas são responsáveis por alterar a estrutura dos ácidos gordos, provocando alterações no comprimento da cadeia de carbono e da posição das ligações duplas, o que influencia as propriedades bioquímicas e a função do AGPI. Por sua vez estas alterações químicas e estruturais contribuem para as alterações verificadas a nível reprodutivo (Mattos et al. 2000).

#### 3.2.1. Fonte natural de AGPI n-3

As dietas tradicionais de ruminantes contêm uma percentagem baixa de gordura bruta (aproximadamente 2,5 a 3,5% da MS). Os óleos de sementes mais comuns em dietas de vacas leiteiras são provenientes da soja, milho, algodão, girassol e linhaça. Além disso vários subprodutos animais e de destilarias de sementes que contenham óleos ou gordura são também comumente encontrados no alimento composto que é fornecido a vacas leiteiras. Os principais AG presentes nos cereais e óleos de sementes são AG com 18 carbonos. Os subprodutos marinhos (ex. óleo de peixe, algas, etc.) são ricos em AGPI de cadeia longa, como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (Chilliard et al. 2007). Os AGPI de cadeia curta como o ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) e linoleico (LA) têm origem maioritariamente vegetal.

Os AGPI são também o tipo de lípido mais predominante na dieta de ruminantes, sendo que o *n*-6 é comumente encontrado em alimentos compostos para vacas leiteiras

de alta produção, enquanto o *n*-3 é fornecido maioritariamente através do uso de linhaça ou de farinha ou óleos de peixe (Moallem 2018). Com os crescentes aumentos nas necessidades energéticas de vacas de alta produção tem-se assistido igualmente a acréscimos no uso de suplementos de gordura (considerados fontes de energia) na nutrição de ruminantes. No entanto, o aumento na proporção de gordura na dieta pode ser prejudicial para os microrganismos ruminais, afetando o seu crescimento e a digestibilidade da fibra (Jenkins 1993). Estes efeitos adversos podem ser reduzidos através da suplementação de gorduras protegidas. Assim, estas gorduras são menos degradadas pelos microrganismos presentes no rúmen, chegando parcialmente intactas ao intestino delgado, onde são absorvidas. Existem vários procedimentos para formar gorduras protegidas: uso de sais de cálcio, encapsulação, extrusão, entre outros (Moallem 2018).

### **3.2.2. Mecanismo através do qual ocorre o aproveitamento pela vaca**

O metabolismo das gorduras que ocorre no rúmen é facilitado pelos microrganismos ruminais, nomeadamente bactérias e protozoários. As lipases bacterianas hidrolisam os triglicéridos e os fosfolípidos presentes no alimento. De seguida ocorre a adição de átomos de hidrogénio às duplas ligações de ácidos gordos insaturados, tornando-os saturados (i.e. ácido esteárico 18:0 e ácido palmítico 16:0), através do processo microbiano chamado biohidrogenação (Otto et al. 2014).

Embora a biohidrogenação ruminal seja considerável, dado que dos AGPI ingeridos, entre 85 e 95% não chega a ser absorvido no intestino delgado, a possibilidade destes animais demonstrarem deficiência neste tipo de AG é muito baixa. Isto porque uma proporção dos ácidos gordos essenciais ingeridos escapa ao processo de biohidrogenação e o processo de utilização e conservação dos mesmos é feito de forma muito eficaz por estes animais, sendo suficiente para manter níveis adequados sob condições normais (McDonald et al. 2011). Ainda assim tem sido feito um esforço no desenvolvimento destes lípidos protegidos.

### **3.2.3. Suplementação de AGPI n-3 e a sua influência na reprodução**

Os AGPI *n*-3 são considerados AG essenciais e necessários ao normal funcionamento de muitos sistemas e processos biológicos: funcionamento do sistema imunitário (Sordillo 2016); expressão de recetores; diversas atividades enzimáticas; coagulação sanguínea; entre outros (Deckelbaum et al. 2006). Os AG são por isso considerados reguladores de processos biológicos em vários tecidos e influenciam diretamente certas funções celulares por serem os principais constituintes da membrana

celular. De entre os vários AG existentes, os AGPI n-6 e os AGPI n-3 são considerados fundamentais para a funcionalidade dos tecidos (Zachut et al. 2010).

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos para analisar a influência da suplementação alimentar com ácidos gordos essenciais na reprodução de vacas leiteiras. Alguns mecanismos através dos quais a suplementação alimentar com gorduras pode influenciar a reprodução incluem: ação no crescimento folicular por influência nas concentrações de insulina; inibição da  $\text{PGF2}\alpha$ , o que promove a longevidade do CL e melhora o balanço energético do animal (Otto et al. 2014). Staples et al. (1998) propuseram que os AGPI n-3 afetam as hormonas reprodutivas através da sua capacidade em regular a produção de  $\text{PGF2}\alpha$  e aumentar a disponibilidade de colesterol a nível do ovário (uma vez que o colesterol é o principal precursor das hormonas esteroides). De acordo com Mattos et al. (2000), o melhoramento reprodutivo resultante da suplementação alimentar com gordura provem do efeito individual de cada ácido gordo e não da suplementação energética que a mesma fornece. No entanto, a informação relativa aos efeitos da suplementação da dieta com ácidos gordos essenciais sobre a reprodução nestes animais é ambígua.

#### **4. Objetivo**

Com este trabalho pretendeu-se determinar a influência do fornecimento de um suplemento alimentar rico em AGPI n-3 no retorno à ciclicidade ovárica normal e na fertilidade, através da avaliação dos parâmetros - intervalo parto-concepção (IPC) e taxa de concepção após IA - durante o período do pós-parto, em vacas leiteiras de alta produção.

#### **5. Material e métodos**

##### **Declaração de ética**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para a Investigação e Ensino (Lisboa, Portugal; referência nº 36/2019). Todos os procedimentos clínicos foram realizados em conformidade com a legislação da União Europeia relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (Diretiva 2010/63/EU).

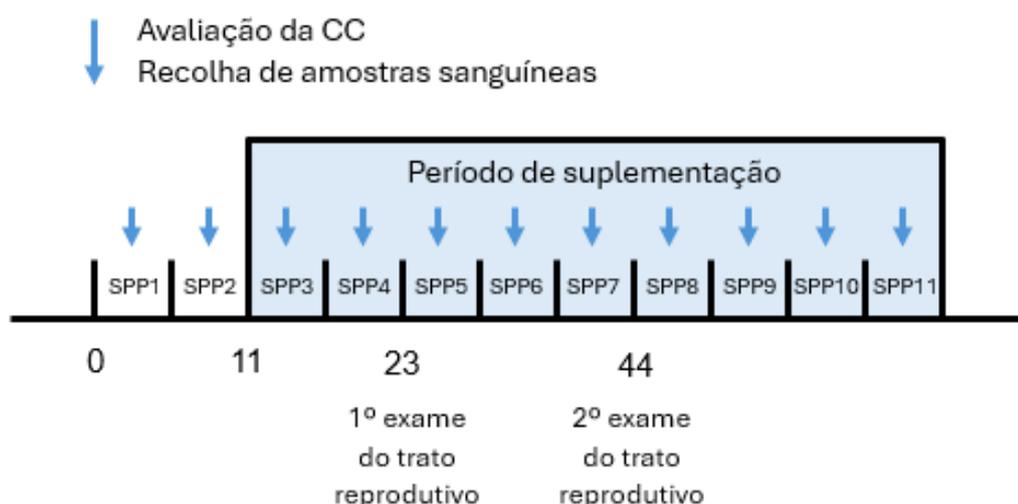
##### **5.1. Desenho experimental**

O estudo foi realizado numa exploração comercial de vacas leiteiras de alta produção. À data da realização do estudo, a exploração possuía 550 vacas da raça

Holstein-Frísia em ordenha, as quais eram ordenhadas três vezes por dia, originando uma produção média de leite de 13 800 L/vaca, ao longo de 305 dias de lactação.

Os animais que fazem parte deste estudo foram selecionados a partir do conjunto de vacas paridas com a recolha e registo de dados a ter início no dia do parto de cada animal (dia 0). Aos  $11 \pm 0,3$  dias pós-parto (DPP) foram selecionados 60 animais que foram distribuídos aleatoriamente por dois grupos. O grupo 1 (n=29), ao qual se deu o nome de grupo n-3, recebeu uma dieta rica num suplemento com ácidos gordos ómega-3. Este suplemento é constituído por óleo de linhaça com um revestimento próprio que o torna resistente à bioidrogenação aquando da sua passagem pelo rúmen (desenvolvido pela empresa SIPENA, em Saint-Malo, França). O grupo 2 (n=31), grupo de controlo, recebeu um suplemento isoenergético constituído por ácidos gordos saturados (óleo de palma hidrogenado). A duração da suplementação da dieta dos dois grupos foi de 9 semanas.

Foi recolhido sangue a todos os animais para a determinação das concentrações de ácidos gordos não esterificados (AGNE) aos 0, 7, 14 e 21 DPP. A figura 1, abaixo, esquematiza o desenho experimental. Todos os animais que sofreram parto distócico, retenção placentária, mastite ou metrite puerperal, hipocalcemia clínica, cetose clínica e/ou claudicação grave até aos 11 DPP não foram incluídos no estudo.



**Figura 1 - Desenho experimental (CC - condição corporal; SPP - semanas pós-parto). Esquema adaptado de Pereira et al. 2022**

## 5.2. Alimentação

A dieta completa (TMR) fornecida aos animais em estudo foi analisada por espectroscopia eletromagnética próxima do espectro dos infravermelhos (NIRS) e foram

registadas as concentrações dos nutrientes que a constituem (anexo 1). A ingestão de matéria seca (IMS) estimada foi de 25 kg/vaca/dia. A suplementação individual foi realizada através do uso de um alimentador automático, ilustrado na figura 2, que permitiu a distribuição de 1,25 kg/dia de suplemento repartido por 4 momentos ao dia. A ingestão diária de cada animal foi registada através do sistema de colar de identificação eletrónica usado na exploração. A TMR dos animais forneceu 38 g/dia de ALA por vaca. Os animais do grupo n-3 receberam em média mais  $25 \pm 4$  g/dia de ALA pela ingestão do suplemento rico em ómega-3, enquanto o óleo de palma hidrogenado ingerido pelos animais do grupo de controlo não forneceu qualquer ALA adicional.



**Figura 2 - Alimentador automático que fez a distribuição dos suplementos**

### **5.3. Amostras de sangue**

As amostras de sangue foram recolhidas de forma asséptica, através da punção da veia coccígea, para tubos secos de 10 mL e tubos com EDTA tripotássico de 10 mL. Na meia hora seguinte à colheita os tubos foram centrifugados (com uma força centrífuga relativa de 2000 g durante 15 min) e foram depois recolhidos o soro e o plasma para tubos de 1,5 mL que foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à sua análise.

### **5.4. Análise das concentrações de progesterona**

No Laboratório de Reprodução da FMV, utilizando o plasma preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , determinaram-se as concentrações de progesterona (P4) no plasma sanguíneo, através de um imunoensaio de quimioluminescência (CLIA), com recurso a um medidor de

progesterona. A determinação das concentrações de P4 com recurso a este imunoensaio foi realizada de acordo com Martin et al. (2007).

A sensibilidade analítica do ensaio é 0,2 ng/mL e o coeficiente de variação interensaio <10%.

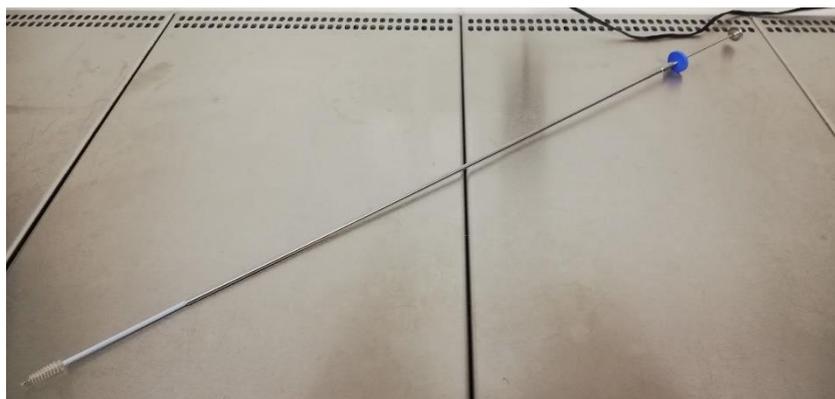
Considerou-se que o retorno à ciclicidade ovárica normal, no período do pós-parto, ocorria quando se atingia uma medição de progesterona no plasma > 1 ng/mL (Colazo et al. 2008).

### **5.5. Condição corporal e indicadores de balanço energético**

A condição corporal das vacas foi registada numa escala de 1 a 5, com incrementos de 0,25, como descrito por Ferguson et al. (1994). Para se poder aferir acerca do balanço energético foram medidos os valores sanguíneos de BHB com recurso a um medidor portátil. As concentrações de AGNE no sangue foram determinadas por análise colorimétrica no laboratório da FMV, com uma sensibilidade analítica de 0,072 mmol/L e um coeficiente de variação interensaio < 5%.

### **5.6. Avaliação do trato genital e citologia endometrial**

O trato genital foi avaliado através de palpação e ecografia transretal (23DDP e 44DPP, Fig. 1). Com recurso ao Metricheck (dispositivo constituído por uma haste de aço acoplado a um pequeno copo de borracha), recolheram-se amostras de corrimento vaginal, as quais foram avaliadas e pontuadas numa de escala de 0 a 3, de acordo com o descrito por Williams et al. (2005). Foram também realizadas citologias endometriais como exame diagnóstico de endometrites subclínicas. As amostras foram obtidas por contacto com a parede uterina, utilizando uma escova cervical estéril (*cytobrush*) adaptada à extremidade de um estilete de inseminação artificial, representada na figura 3. O método de recolha utilizado foi o descrito por Pascottini et al. (2016). Após a recolha da amostra, a escova foi aposta e rolada gentilmente ao longo do comprimento de duas lâminas de microscópio, que foram posteriormente identificadas e secas ao ar. As lâminas foram coradas com a técnica de coloração rápida Diff-Quick e foi obtida a percentagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) através da contagem total de 400 células. Os métodos de recolha e avaliação das citologias endometriais utilizados estão de acordo com os descritos por Pereira et al. (2020). Os valores de *cut-off* usados por Pereira et al. (2022) para a identificação de endometrites subclínicas foram:  $\geq 18\%$  aos 23 DEL (Kasimanickam et al. 2004) e  $\geq 5\%$  aos 44 DEL (Gilbert et al. 2005). Vacas com valores inferiores a 18% e 5% aos 23 e 44 DEL, respetivamente, foram consideradas sem endometrite.



**Figura 3 - Escova adaptada à extremidade de um estilete de inseminação artificial, utilizada para recolha das amostras para citologia (*cytobrush*)**

### **5.7. Maneio reprodutivo**

Os animais passaram por um período voluntário de espera de 45 dias, após o qual foram inseminados assim que era observado o primeiro cio. As vacas que não exibissem sinais de cio até aos 75 DPP eram sujeitas a um protocolo de OvSynch com Inseminação Artificial a Tempo Fixo (IATF). A gestação foi confirmada através de ecografia transretal, aos 39 dias após IA.

### **5.8. Recolha de informação**

Os dados relativos à fertilidade dos animais em estudo foram obtidos a partir do software de gestão da exploração, Dairy Plan® 5.3 (GEA Farm Technologies). Mais concretamente, foram extraídas listagens com informações relativas ao número de partos, ao intervalo parto-concepção, ao número de IAs realizadas, à quantidade de leite produzido e à quantidade de suplemento ingerido pelos animais dos dois grupos em estudo.

Foi criado um ficheiro de Microsoft Excel® com os dados recolhidos durante o estudo, o qual foi posteriormente utilizado para efeitos de tratamento desses mesmos dados e para a realização da análise estatística.

Foi atribuído um número (de 1 a 60) a cada animal, para a sua identificação. Introduziu-se, para cada animal: o grupo a que pertencia (grupo n-3 ou grupo controlo), o número de partos (de 1 a 4), o intervalo parto-concepção (em dias), o número de inseminações artificiais (IAs) realizadas até se obter a confirmação de uma gestação positiva, a ingestão total de suplemento fornecido (ómega-3 ou óleo de palma hidrogenado, conforme o grupo a que pertenciam) e a percentagem de PMN das

citologias endometriais (realizadas aos dias 23 e 44 após o parto). Os dados referentes à ingestão semanal de suplemento fornecido (em kg), à condição corporal (escala de 1 a 5), aos valores de progesterona plasmática, de  $\beta$ -hidroxibutirato e de ácidos gordos não esterificados (AGNE) foram recolhidos e registados individualmente, uma vez por semana, durante onze semanas, ou seja, durante as duas semanas iniciais desde o parto até aos 11 DDP, altura em que iniciaram a ingestão do suplemento, seguidas das restantes nove semanas de suplementação.

## 5.9. Análise estatística

Os dados recolhidos ao longo do tempo em que decorreu o estudo permitiram obter diferentes variáveis com interesse para a questão proposta a estudar neste trabalho. Com recurso ao programa estatístico SAS (SAS 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foram analisadas as seguintes variáveis de interesse para o estudo: valores de AGNE; valores de BHB; número de partos; CC; percentagem de PMNs da citologia uterina realizada aos 23 DPP (CIT1); tipo de suplemento de gordura; quantidade de suplemento ingerido; produção leiteira. Foi feita a comparação entre as variáveis e o tempo decorrido até à primeira ovulação pós-parto (DPP em que a P4 foi  $> 1$  ng/ml). Neste estudo admitiu-se que a primeira ovulação pós-parto tinha ocorrido quando os valores plasmáticos de progesterona eram superiores a 1 ng/ml.

O método estatístico utilizado foi a análise de sobrevivência, uma vez que permite analisar dados *time to event* e variáveis tempo-dependentes como as avaliadas neste estudo. O tempo que decorreu até ocorrer um certo evento relevante nesta análise foi o intervalo entre o parto e a primeira ovulação, uma vez que a primeira ovulação pode ser indicativa de retorno à ciclicidade ovárica normal. Para que as variáveis pudessem ser analisadas e comparadas através de modelos estatísticos de prognóstico foi primeiro necessário fazer uma seleção das mesmas. Utilizou-se o *backward elimination test* que nos permite remover do modelo de análise, um por um, preditores não significativos, para que fiquemos apenas com variáveis estatisticamente significativas (para um valor de  $P < 0,05$ ). A escolha do *backward elimination test* vai ao encontro do descrito por Heinze and Dunkler (2017) para a seleção de variáveis a usar em modelos de prognóstico, utilizando como critério de exclusão um valor de  $P > 0,157$ .

Após a realização deste teste, das oito variáveis iniciais, apenas as variáveis DPP em que a P4 foi  $> 1$  ng/ml e CIT1 foram selecionadas para integrarem o modelo final do estudo - modelo *Cox proportional hazard*. Este modelo permite descrever o efeito das variáveis na análise de sobrevivência. A variável quantitativa CIT1 foi

transformada em categórica, com e sem endometrite (com um *cut-off* para um valor de PMN  $\geq 18\%$ ), para posterior construção das curvas de Kaplan Meyer, mais à frente apresentadas, as quais permitem uma análise e comparação facilitada das variáveis.

A taxa de concepção à primeira IA e o IPC foram os dois parâmetros de fertilidade analisados estatisticamente. Foi feita a comparação entre estes e o tipo e quantidade de suplemento ingerido pelos animais, nos dois grupos. Foi também realizada a análise entre o número de partos e o IPC.

## **6. Resultados**

Os dados recolhidos foram avaliados e foi feita a comparação estatística entre variáveis. Os resultados obtidos através da análise estatística foram divididos em dois temas:

- a) Estudo do intervalo decorrido entre o parto e a primeira ovulação pós-parto e das influências sobre o retorno à atividade lútea no pós-parto;
- b) Estudo do intervalo parto-concepção.

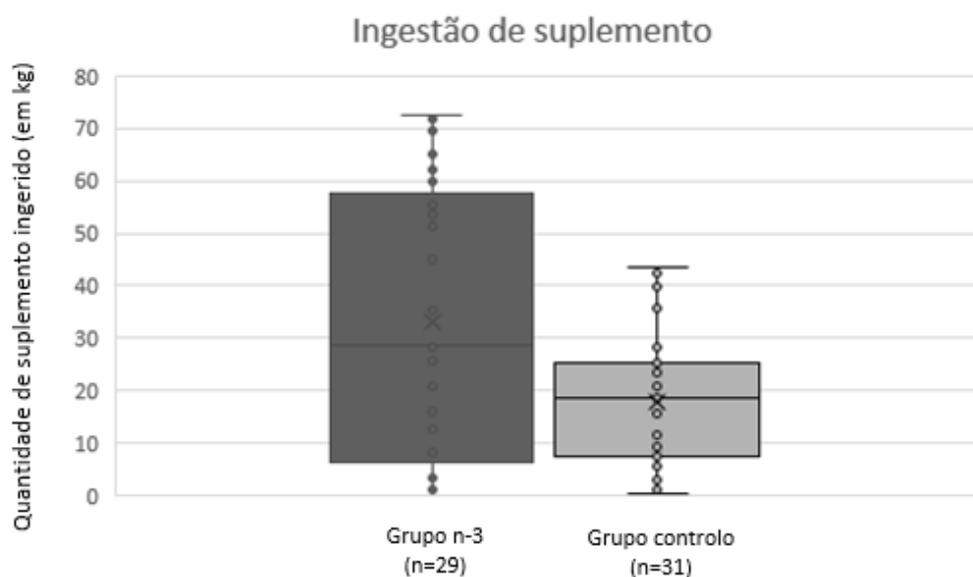
A descrição dos resultados obtidos em cada tema encontra-se descrita de seguida.

### **6.1. Intervalo entre o parto e a primeira ovulação pós-parto**

Em comparação com o grupo controlo, a suplementação alimentar do grupo de estudo (grupo n-3) não teve impacto no intervalo até à primeira ovulação ( $P = 0,24$ ).

A quantidade de suplemento ingerido, em ambos os grupos, foi muito variável entre os animais, como é possível verificar no gráfico 1. Foi possível verificar uma diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de suplemento ingerido nos dois grupos ( $P = 0,004$ ).

**Gráfico 1 - Boxplot da quantidade de suplemento ingerido (em kg) por cada animal, em cada um dos grupos**



As variáveis - medição sanguínea de AGNE aos -7, 7, 14 e 21 DPP e de BHB aos 14, 21, 28 e 35 DPP - também não tiveram impacto no tempo até à ovulação pelo que não foram incluídas no modelo final. A tabela 1 mostra a variação dos valores médios das medições de AGNE e de BHB entre o grupo n-3 e o grupo controle.

**Tabela 1 - Média e desvio padrão dos valores das medições de AGNE e de BHB (em mmol/L) nos dois grupos**

	AGNE		BHB	
	Grupo n-3 (n=29) $\bar{x} \pm s$	Grupo controle (n=31) $\bar{x} \pm s$	Grupo n-3 (n=29) $\bar{x} \pm s$	Grupo controle (n=31) $\bar{x} \pm s$
-7 DPP	0,10 ± 0,06	0,14 ± 0,16	—	—
7 DPP	0,26 ± 0,28	0,24 ± 0,31	—	—
14 DPP	0,16 ± 0,14	0,18 ± 0,19	1,05 ± 0,76	0,97 ± 0,44
21 DPP	0,16 ± 0,12	0,17 ± 0,13	1,05 ± 0,71	1,02 ± 0,59
28 DPP	—	—	1,15 ± 0,85	0,80 ± 0,33
35 DPP	—	—	0,86 ± 0,39	0,93 ± 0,47

O efeito do número de partos (primíparas vs multíparas) não teve impacto no tempo até à ovulação, assim como a condição corporal ao parto e a diferença de condição corporal ao parto e aos 14, 21, 28 e 49 DPP. Os valores médios das avaliações da CC, no grupo n-3 e no grupo controlo, ao longo do intervalo de estudo, encontram-se representados na tabela 2.

**Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores de condição corporal nos dois grupos**

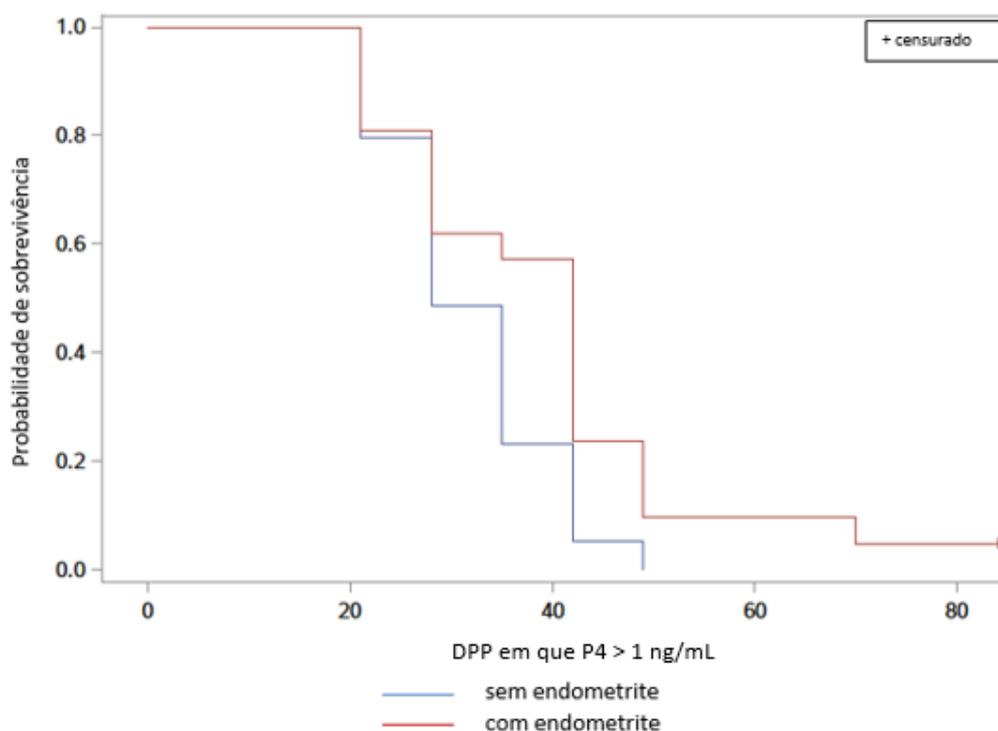
	Condição corporal	
	Grupo n-3 (n=29)	Grupo controlo (n=31)
	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$
-7 DPP	3,28 ± 0,21	3,28 ± 0,18
7 DPP	3,13 ± 0,15	2,98 ± 0,19
14 DPP	3,11 ± 0,19	2,99 ± 0,22
21 DPP	2,99 ± 0,22	2,98 ± 0,25
28 DPP	2,91 ± 0,23	2,92 ± 0,22
35 DPP	2,91 ± 0,21	2,98 ± 0,22
42 DPP	2,90 ± 0,21	2,83 ± 0,24
49 DPP	2,91 ± 0,27	2,84 ± 0,24
56 DPP	2,96 ± 0,25	2,82 ± 0,26
63 DPP	2,96 ± 0,26	2,84 ± 0,27
70 DPP	2,93 ± 0,27	2,84 ± 0,30
77 DPP	2,97 ± 0,31	2,87 ± 0,34

A quantidade de leite produzido até aos 50 DPP também não teve impacto observável no tempo até à primeira ovulação e o mesmo aconteceu com a quantidade de leite produzida até aos 100 DPP.

O diagnóstico de endometrite subclínica por citologia aos 23 DPP (com um *cut-off* para valores  $\geq 18\%$  PMN) afetou o intervalo entre o parto e o retorno à atividade lútea no pós-parto (vacas com endometrite tiveram um *hazard ratio* de ovulação de 0,425 em comparação com vacas saudáveis ( $P = 0,004$ )).

Além disso, é possível observar nas curvas de Kaplen Meyer apresentadas abaixo, no gráfico 2, que animais sem endometrite tiveram a primeira ovulação pós-parto mais cedo quando comparados com animais com endometrite.

**Gráfico 2 - Curvas de Kaplan Meyer, onde se comparam dois grupos de animais, com e sem endometrite, e o tempo, em dias, que decorre até à primeira ovulação pós-parto (DPP, dias pós-parto; P4, progesterona)**



## 6.2. Taxa de concepção e intervalo parto-concepção

A taxa de concepção após a primeira IA não foi influenciada pelo tipo de suplemento fornecido, mas sim pela quantidade de suplemento ingerido, ou seja, a taxa de concepção após a primeira IA aumentou com o aumento da ingestão de ambos os suplementos de gordura ( $P = 0,015$ ). Esta influência manifestou-se através do aumento da probabilidade de concepção à 1ª IA, de 1,037 vezes por cada quilograma de suplemento ingerido, no período total do estudo, independentemente do tipo de suplemento.

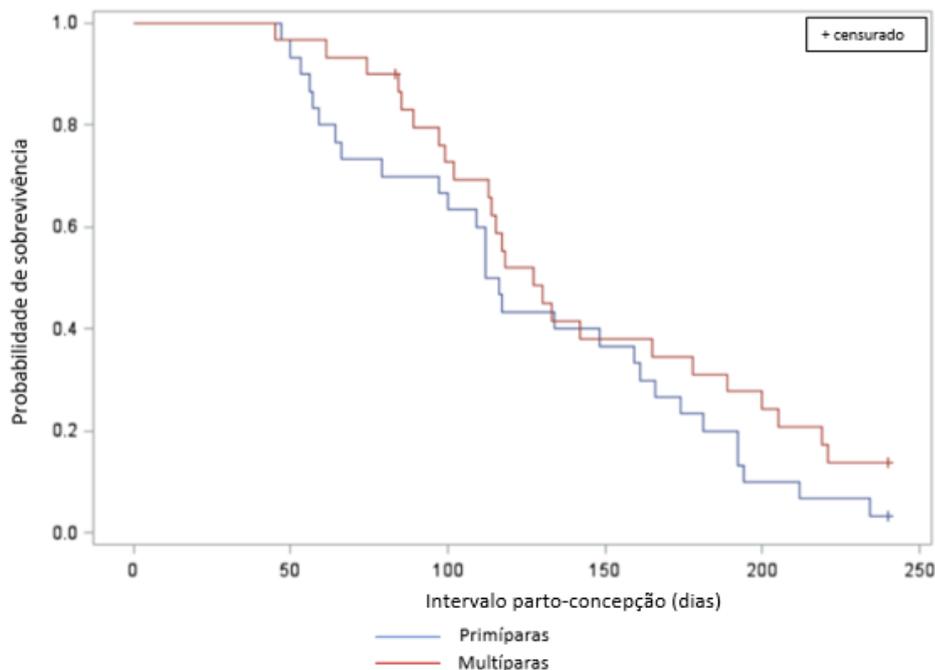
Em relação ao IPC, foi possível verificar que:

1) O *hazard ratio* de concepção em vacas que ingeriram AGPI n-3 aumentou 1,009 vezes por cada quilograma de suplemento ingerido ( $P = 0,004$ ). Por sua vez, no grupo de controlo, vacas a ingerir quantidades cada vez maiores de óleo de palma hidrogenado exibiram uma tendência ( $P = 0,062$ ) para um *hazard ratio* de concepção mais baixo (0,977).

2) O efeito do número de partos teve impacto no intervalo parto-concepção. Vacas primíparas tiveram um *hazard ratio* de concepção mais alto (1,832) do que vacas

multíparas ( $P = 0,034$ ). É possível observar nas curvas de Kaplan Meyer apresentadas de seguida no gráfico 3, que a maioria dos animais pertencentes ao grupo de primíparas têm um intervalo parto-concepção mais curto quando comparadas com vacas multíparas.

**Gráfico 3 - Curvas de Kaplan Meyer onde se comparam dois grupos de animais, primíparas e multíparas, e o tempo, em dias, que decorre entre o parto e a concepção**



## 7. Discussão

O presente trabalho avaliou os efeitos da suplementação da dieta de vacas leiteiras altas produtoras com ácidos gordos ómega-3 (provenientes de linhaça protegida contra a ação dos microrganismos ruminais) em determinados indicadores metabólicos e reprodutivos e a sua influência no retorno à atividade lútea e na fertilidade no pós-parto.

Vários estudos já realizados permitiram demonstrar os efeitos benéficos da suplementação da dieta de vacas leiteiras com ácidos gordos ómega-3 na fertilidade e saúde destes animais. As interações entre os processos reprodutivos e a nutrição são complexas e por isso torna-se difícil estudar os efeitos específicos de determinados nutrientes na função ovárica. De acordo com Ambrose (2021), a adição de óleos de sementes ricos em AG de cadeia longa à dieta, tais como, ácido linoleico ou ácido linolénico durante o período do pré-parto mostrou reduzir o intervalo entre o parto e a primeira ovulação. Têm sido estudados os efeitos do fornecimento de aditivos energéticos (gordura protegida ou gordura *bypass*) na alimentação da vaca leiteira no

BEN, através do aumento que provocam na densidade energética da dieta. Esta estratégia nutricional consiste na utilização de AG que possam influenciar positivamente o balanço energético no início do PP, através do fornecimento de grandes quantidades de energia numa altura em que a IMS está diminuída. Assim, a mobilização lipídica será menos intensa e terá um menor efeito negativo no metabolismo hepático (Pickett et al. 2003).

### **7.1. Intervalo entre o parto e a primeira ovulação pós-parto**

No presente estudo, a suplementação alimentar com ácidos gordos ómega-3 não teve impacto no tempo decorrido até à primeira ovulação pós-parto. O mesmo verificou-se com a suplementação feita com óleo de palma ao grupo de controlo. Era esperado que o grupo de estudo, cuja dieta foi suplementada com ácidos gordos ómega-3, demonstrasse um intervalo parto-primeira OV mais curto que o grupo de controlo, ou seja, que a ingestão de ácidos gordos ómega-3 tivesse uma influência positiva no retorno à ciclicidade ovárica normal no pós-parto. O retorno aos ciclos éstricos no pós-parto é influenciado por vários fatores o que dificulta a investigação de influência da suplementação alimentar. Ainda assim, Colazo et al. (2009) demonstraram a existência de relação positiva entre a ingestão de ácidos gordos ómega-3 e o retorno mais rápido à ciclicidade no pós-parto. Neste trabalho não se conseguiu verificar esta relação. Isto poderá dever-se ao tamanho reduzido da amostra em estudo ou às quantidades muito variáveis de suplemento ingerido pelos diferentes animais, tornando difícil a obtenção de uma comparação estatística relevante. No entanto, também existem estudos que obtiveram resultados negativos relativos à suplementação com ácidos gordos ómega-3. No caso de Zachut et al. (2011), os autores verificaram uma tendência para um atraso no pico de LH nos animais que foram suplementados com ácidos gordos n-3, o que fez com que apresentassem uma primeira ovulação pós-parto mais tardia.

#### **7.1.1. BEN e a sua influência no retorno à ciclicidade no pós-parto**

Neste trabalho foram analisados vários dados e comparadas variáveis que estão diretamente relacionados com o BEN. Animais a produzir maiores quantidades de leite tenderiam a apresentar um BEN mais marcado e como tal teorizava-se que teriam uma ovulação PP mais tardia. O mesmo era esperado na análise dos dados relativos à CC. Animais com valores extremos de CC ou que demonstrassem uma perda significativa da mesma durante o período de transição teriam, em teoria, um BEN mais acentuado. Por sua vez na análise do número de partos era esperado que vacas primíparas

apresentassem um maior BEN e por consequência um retorno à ciclicidade mais tardio que vacas multíparas.

Tem sido demonstrado que um retorno precoce à atividade ovárica tem uma subsequente melhoria na fertilidade. Por sua vez, vacas em BEN são mais predispostas à supressão dos pulsos de LH e a uma reduzida sensibilidade do ovário à LH. Um folículo que se desenvolva sob estas condições tem maior probabilidade de se tornar não ovulatório, o que resulta no atraso do retorno à ciclicidade (Kadokawa et al. 2006; Bisinotto et al. 2012). O BEN altera os perfis de LH, assim como os de glucose, insulina e IGF-1, limitando a produção de estrogénio pelo folículo dominante (Butler 2003). Consequentemente o tempo que decorre entre o parto e a primeira ovulação está grandemente relacionado com o BEN.

O estado metabólico e o balanço energético têm um papel crucial no controlo da secreção de gonadotrofinas, influenciando o retorno aos ciclos éstricos no pós-parto. Para que este ocorra é crucial que o eixo hipotálamo-hipófise-ovário esteja a funcionar sem quaisquer impedimentos (Chagas et al. 2007). Além disso, o atraso na primeira ovulação está altamente relacionado com uma taxa de gestação mais baixa e com o aumento do intervalo entre partos (Gautam et al. 2010), o que se traduz numa fertilidade prejudicada.

Neste estudo, não foi possível encontrar correlação estatística entre os valores de AGNE e de BHB e o tempo decorrido entre o parto e a primeira ovulação PP. Pretendia-se, através da medição e análise dos AGNE e de BHB no plasma sanguíneo, nas semanas que se seguiram ao parto, analisar a influência do BEN no tempo até à ovulação, teorizando que este seria maior quanto maiores os valores de BHB e de AGNE, uma vez que o BHB é indicador de cetose e os AGNE nos permitem avaliar a mobilização de gordura corporal (Chagas et al. 2007).

#### **7.1.1.1. Número de partos no retorno à ciclicidade**

O efeito do número de partos (primíparas vs multíparas) não teve impacto no tempo até à ovulação. Era esperado que animais primíparos apresentassem uma ovulação mais tardia quando comparados com animais multíparos uma vez que animais mais jovens, além de terem de suprir as necessidades energéticas da produção leiteira, também direcionam parte da sua energia para o seu crescimento. Alguns estudos mais antigos, como é o caso do artigo de Berglund et al. (1989), já mostravam que vacas primíparas apresentavam um atraso no retorno à ciclicidade ovárica no pós-parto e demonstravam existir associação entre o número de partos e o BEN. Petersson et al. (2006) e Tanaka et al. (2008) também mostraram que vacas primíparas apresentavam

um atraso no retorno à ciclicidade. Pelo contrário, Fonseca et al. (1983) concluíram que animais mais jovens tinham a primeira ovulação mais cedo que animais mais velhos e, Darwash et al. (1997) que o intervalo entre o parto e o começo da atividade lútea no PP era progressivamente mais longo à medida que o número de partos aumentava.

O BEN de vacas leiteiras varia com o número de partos, pois as vacas primíparas são mais suscetíveis ao stress metabólico durante o período de transição (Berry et al. 2006; Wathes et al. 2007; Folnožić et al. 2016). Os perfis metabólicos e endócrinos de animais primíparos encontram-se mais desequilibrados quando comparados com os de vacas múltiparas, o que resulta numa recuperação do BEN mais lenta e prolongada. Existem diferenças no que concerne à forma como animais com diferente número de partos fazem a mobilização das suas reservas corporais, o que poderá promover a repartição de nutrientes para o crescimento durante a primeira lactação (Mekuriaw 2023). Contrariamente, Friggens et al. (2007) reportaram que vacas primíparas exibiam um BEN menos acentuado.

#### **7.1.1.2. Condição corporal**

Analisou-se a CC ao parto e as diferenças de CC ao parto e aos 14, 21, 28 e 49 DPP e verificou-se que não produziam efeito no tempo até à primeira ovulação pós-parto. A avaliação da CC ao parto é provavelmente a pontuação com maior influência em toda a curva de lactação da vaca, uma vez que afeta a IMS no início da lactação, a perda de CC no pós-parto, a produção leiteira, a imunidade do animal e influencia a capacidade reprodutiva dos animais (Roche et al. 2009). Existe evidência dos efeitos negativos nos ciclos éstricos de vacas leiteiras provocados pela CC excessiva (Silvestre et al. 2011). Moreira et al. (2001) e Santos et al. (2004) reportaram existir uma associação negativa entre a CC e a incidência de anestro no pós-parto. Também Ferguson et al. (1994) reportaram que o estado energético da vaca leiteira afeta o seu retorno aos ciclos éstricos normais e que a CC do animal é um indicador das suas reservas corporais, maioritariamente de gordura. Taylor et al. (2003) mostrou que vacas com atraso no retorno à ciclicidade apresentavam os valores de peso corporal mais baixos e as maiores perdas de CC.

Pushpakumara et al. (2003) e Kadivar et al. (2014) reportaram que vacas que perdem mais do que uma unidade de CC durante o primeiro mês PP experienciam um intervalo mais longo entre o parto e a sua primeira ovulação.

No estudo de Butler e Smith (1989) registou-se um aumento significativo no número de dias até à primeira ovulação em animais que perderam mais do que uma unidade de CC, tendência também demonstrada por Shrestha et al. (2005). Os autores

deste último estudo mostraram que vacas com um atraso na primeira ovulação, apresentavam uma CC aos 5, 7, 9 e 11 SPP mais baixa, quando comparadas com vacas com um intervalo parto-1ªOV normal. No entanto, tal como no presente trabalho, Senatore et al. (1996) não encontraram relação entre a CC ao parto ou a perda de CC e os dias decorridos entre o parto e a primeira ovulação. Uma justificação plausível para o facto de não ter sido possível fazer esta relação recai sobre as falhas que a avaliação da CC apresenta. Trata-se de uma avaliação subjetiva e, embora permita avaliar o nível de gordura subcutânea que a vaca possui com uma exatidão razoável, é um método ineficiente na previsão da gordura intermuscular e intramuscular (Roche et al. 2013). Além disso, sabe-se que a deposição de gordura subcutânea não ocorre da mesma forma que a deposição de gordura abdominal e que as ferramentas de avaliação da CC são ineficazes na deteção da variabilidade da deposição de gordura abdominal. A investigação realizada por Melendez et al. (2024) permitiu verificar que animais com a mesma classificação de CC apresentavam variações nos depósitos de gordura intra-abdominal o que pode ajudar a explicar o facto de animais com pontuações de CC adequadas ao parto poderem vir a desenvolver doenças metabólicas em resultado do excesso de gordura abdominal.

#### **7.1.1.3. Produção leiteira e BEN**

A quantidade de leite produzido até aos 50 DPP não teve impacto estatisticamente revelante no tempo até à primeira ovulação e o mesmo aconteceu com a quantidade de leite produzida até aos 100 DPP. Através do estudo mais antigo de Butler et al. (1981) é possível perceber que a produção leiteira está diretamente relacionada com a quantidade de dias até à primeira ovulação. Os dados de Taylor et al. (2004) mostram que vacas altas produtoras e simultaneamente com perfis anormais de P4 produziam mais leite, tanto no pico da lactação como durante toda a curva de lactação, do que animais com ciclos éstricos normais. Estes resultados sugerem que em animais altos produtores (> 45 kg/d no pico de lactação) a produção leiteira pode estar relacionada com a incidência de alterações ováricas. Além disso, vacas a produzir mais leite apresentam um maior balanço energético negativo e é expectável que apresentem uma primeira ovulação mais tardia quando comparadas com vacas de menor produção leiteira, mas não foi possível verificar essa relação com relevância estatística neste estudo. Os animais presentes na exploração e incluídos no estudo são animais de alta produção e, embora as produções variem entre animais e ao longo da curva de lactação, quase todos atingem uma produção de 45 kg/d de leite no pico da curva de lactação. Talvez por isso o impacto da produção leiteira no intervalo entre o

parto e a primeira ovulação pós-parto não tenha sido tão evidente como seria caso a comparação fosse, por exemplo, entre vacas de baixa e alta produção.

Vacas com um acentuado BEN apresentam um intervalo parto-início da ciclicidade ovárica mais prolongado (Opsomer et al. 2000; Shin et al. 2015), o que mostra que os animais adiam a entrada à reprodução para que o balanço energético não comprometa a sobrevivência do embrião/feto ou da vaca.

Existem várias opções para manipular a dieta de forma a mitigar o BEN e reduzir o período de anestro pós-parto. No entanto, os resultados apresentados pela bibliografia sobre o assunto, são bastante variáveis e nem sempre é possível transpô-los para soluções práticas e económicas que possam ser integradas no dia-a-dia numa exploração leiteira (Ambrose 2021).

### **7.1.2. Endometrite e retorno à atividade lútea no pós-parto**

O diagnóstico de endometrite subclínica por citologia aos 23 DPP (*cut-off*  $\geq$  18% PMN) teve influência no intervalo entre o parto e o retorno à atividade lútea no pós-parto e verificou-se que animais sem endometrite tiveram a primeira ovulação pós-parto mais cedo quando comparados com animais com endometrite (como é possível observar nas curvas do gráfico 2, apresentadas nos resultados).

Os efeitos prejudiciais das infeções uterinas sobre o desenvolvimento folicular no pós-parto têm sido reportados por vários estudos (Rosales and Ametaj 2021). O estudo de Williams et al. (2007) demonstrou que a foliculogénese é interrompida pela infeção bacteriana, uma vez que esta provoca supressão do crescimento e função do primeiro folículo dominante. A presença de mediadores pró-inflamatórios (por ex. fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e de LPS (lipopolissacáridos-endotoxinas) suprimem o crescimento folicular e a produção de estradiol, o que também provoca uma diminuição da probabilidade de ovulação do folículo dominante (Sheldon et al. 2002).

A endometrite subclínica persistente pode resultar numa produção desequilibrada de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que ocorre durante a primeira semana pós-parto (Angel et al. 2018). A ativação diminuída de citocinas pró-inflamatórias prejudicam a resolução da infeção bacteriana endometrial, o que, em conjunto com o estímulo pró-inflamatório persistente após a terceira SPP, mantém um ambiente desfavorável ao desenvolvimento embrionário (Sheldon et al. 2019).

## **7.2. Análise da fertilidade do grupo de animais em estudo**

Os dados recolhidos neste estudo permitiram investigar o efeito do BEN no retorno à ciclicidade. Além disso, também permitiram estudar a fertilidade dos grupos

de animais através da análise de alguns parâmetros como o intervalo parto-concepção e a taxa de concepção.

### **7.2.1. Taxa de concepção à 1ª IA e suplementação da dieta com linhaça**

Com base na literatura consultada, supôs-se que a ingestão de um suplemento rico em ácidos gordos ômega-3 permitiria melhorar a taxa de concepção à 1ª IA. No entanto, após a análise estatística verificou-se que a taxa de concepção após a primeira IA não foi influenciada pelo tipo de suplemento fornecido. No estudo realizado por Petit e Benchaar (2007), a taxa de concepção à 1ª IA era superior em animais suplementados com linhaça extrudida (54,3%) quando comparada com a taxa de concepção à 1ª IA de animais cuja dieta era suplementada com soja (40%). Os dados de Moallem (2018) revelaram que animais suplementados com linhaça no período do periparto mostraram uma tendência para apresentar os intervalos dos dias em aberto e dos dias entre a 1ª IA e concepção mais curtos quando comparados com animais não suplementados. Além disso, o grupo de animais cuja dieta foi suplementada com linhaça também exibiu uma diminuição na incidência de cetose e de metrite grave e uma marcada redução na mortalidade animal.

Embora a taxa de concepção à 1ª IA não tenha sido afetada pelo tipo de suplemento fornecido, foi influenciada pela quantidade de suplemento que os animais ingeriram. A probabilidade de concepção à 1ª IA aumentou 1,037 vezes por cada quilograma de suplemento ingerido, independentemente de se tratar de linhaça ou óleo de palma, ou seja, a taxa de concepção após a primeira IA aumentou em associação com o aumento da ingestão de ambos os suplementos de gordura. Este resultado está de acordo com a informação revista na meta-análise de Rodney et al. (2015), a qual também conclui que o fornecimento de gordura na dieta de vacas leiteiras tem uma tendência para aumentar a produção, quando fornecida durante o período de transição e que a ingestão de gorduras durante o período de transição pode ser um componente essencial no controlo da mobilização de tecido adiposo no início da lactação e na limitação da quantidade de hidratos de carbono fermentáveis. Tal como no presente estudo, apenas encontra influência da quantidade de gordura ingerida sobre a fertilidade e não consegue identificar interferências no que diz respeito à suplementação com diferentes tipos de ácidos gordos.

## 7.2.2. Intervalo parto-concepção

A influência da suplementação da dieta na taxa de concepção à primeira IA refletiu-se num IPC mais curto nos animais suplementados com ácidos gordos ómega-3, o que não se verificou no grupo de controlo. A diminuição no IPC que ocorreu nos animais do grupo n-3 foi proporcional à quantidade de suplemento ingerido. De acordo com McNamara et al. (2003), algumas investigações demonstraram um aumento na taxa de concepção à primeira IA após a suplementação com AGPI. Estes autores propuseram que o aumento na taxa de concepção à primeira IA pode ocorrer por diminuição da mortalidade embrionária precoce.

Foi possível observar que o número de partos teve efeito no IPC, uma vez que vacas primíparas apresentaram um *hazard ratio* de concepção mais alto do que vacas múltiparas e que a maioria dos animais pertencentes ao grupo de primíparas apresentou um intervalo parto-concepção mais curto quando comparadas com vacas múltiparas (ver gráfico 3, pág. 28). Embora as vacas primíparas canalizem parte da sua energia para o seu crescimento prejudicando o seu retorno à ciclicidade no PP, o facto de o útero destes animais só ter sido exposto a um parto pode justificar a melhor fertilidade que se verificou nestes animais. Embora a incidência de partos distócicos seja mais elevada em primíparas, as vacas múltiparas têm uma maior probabilidade de sofrer retenção placentária e alterações ováricas morfológicas, que aumentam o IPC (Fodor et al. 2019).

Atualmente, presume-se que continuam a existir mecanismos através dos quais os ácidos gordos ómega-3 exercem os seus efeitos e que não se encontram totalmente esclarecidos. Além disso, os resultados de alguns dos estudos realizados sobre os efeitos da suplementação da dieta com ácidos gordos ómega-3 na reprodução de vacas leiteiras não são concordantes. Tal pode dever-se ao uso de diferentes fontes de gordura, amostras de animais com números bastante variáveis e calendarizações de suplementação diferentes (Otto et al. 2014).

## 8. Conclusão

Este trabalho fez a avaliação de parâmetros reprodutivos e a sua comparação entre dois grupos de vacas leiteiras cujas dietas foram suplementadas com dois tipos de gorduras diferentes.

Permitiu verificar que o grupo de animais aos quais foi fornecida a suplementação com ácidos gordos n-3 apresentaram um IPC menor e um risco de

concepção mais elevado. Independentemente do tipo de suplemento ingerido, a taxa de concepção à primeira IA aumentou com o aumento da quantidade de suplemento ingerido. Os resultados do estudo também permitiram demonstrar que o número de partos teve efeito no IPC, uma vez que vacas primíparas apresentaram um risco de concepção mais elevado que vacas multíparas.

Contudo, não foi possível observar influência da suplementação com ácidos gordos ómega-3 no retorno precoce à ciclicidade no pós-parto, como inicialmente teria sido expectável. As diferenças nas quantidades de suplemento ingerido entre os diferentes animais tornaram difícil a comparação de parâmetros entre os dois grupos em estudo e a obtenção de resultados estatisticamente significativos.

Adicionalmente, o estudo permitiu observar que animais que desenvolveram endometrite subclínica a partir da terceira semana pós-parto, independentemente da dieta que ingeriram, apresentaram uma primeira ovulação pós-parto mais tardia quando comparados com animais saudáveis.

Este trabalho permitiu estudar alguns aspetos da suplementação da dieta com ácidos gordos ómega-3 no intervalo entre o parto e a concepção em vacas leiteiras de alta produção. No entanto, existiram diversas variáveis que não ofereceram resultados estatisticamente significativos. A principal limitação do estudo prendeu-se com a discrepância verificada na ingestão do suplemento em ambos os grupos. Os ácidos gordos n-3 podem ser formulados em suplemento com um potencial benefício na fertilidade e rentabilidade produtiva de vacas leiteiras. Contudo, há ainda muitas variáveis desconhecidas que devem ser estudadas primeiro.

## Referências Bibliográficas

Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 54:17–32.

Adewuyi A, Gruysi E, Eerdenburg F. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly.* 27(3):117–126. doi:10.1080/01652176.2005.9695192.

Ambrose DJ. 2021. Postpartum Anestrus and Its Management in Dairy Cattle. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction.* 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 408-430

Angel L, Vigo M, José J, Barrio M, Herradón P, Martínez A. 2018. Subclinical Endometritis in Dairy Cattle. In: Payan-Carreira R, editor. *New Insights into Theriogenology.* IntechOpen. p. 79–97.

Atashi H, Chen Y, Chelotti J, Lemal P, Gengler N. 2024. Prediction of body condition score throughout lactation by random regression test-day models. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 00:1–9. doi:10.1111/jbg.12890.

Bajcsy Á, Szenci O, Doornenbal A, Van Der Weijden G, Csorba C, Kocsis L, Szucs I, Ostgard S, Taverne M. 2005. Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology.* 64(1):99–111. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.11.005.

Bauman D, Currie WB. 1980. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science.* 63(9):1514–1529. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)83111-0.

Berglund B, Danell B, Janson L, Larsson K. 1989. Relationships between Production Traits and Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica.* 39(2):169–179. doi:10.1080/00015128909438510.

Berry D, Veerkamp R, Dillon P. 2006. Phenotypic profiles for body weight, body condition score, energy intake, and energy balance across different parities and concentrate feeding levels. *Livest Sci.* 104(1–2):1–12. doi:10.1016/j.livsci.2006.02.012.

Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Martinez N, Lima F, Staples C, Thatcher W, Santos J. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. In: *Anim Reprod.* p. 260–272.

Butler S, Pelton S, Butler W. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Dairy Sci.* 89(8):2938–2951. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72566-8.

Butler W. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci.* 83(2–3):211–218. doi:10.1016/S0301-6226(03)00112-X.

Butler W, Everett R, Coppock C. 1981. The Relationships between Energy Balance, Milk Production and Ovulation in Postpartum Holstein Cows. *J Anim Sci.* 53(3):742–748. doi:https://doi.org/10.2527/jas1981.533742x. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/53/3/742/4662786>.

Butler W, Smith R. 1989. Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 72(3):767–783. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79169-4.

Canfield R, Butler W. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 7(3):323–330. doi:10.1016/0739-7240(90)90038-2.

Cargile B, Tracy D. 2021. Interaction of Nutrition and Reproduction in the Dairy Cow. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 389-398

Chagas L, Bass J, Blache D, Burke C, Kay J, Lindsay D, Lucy M, Martin G, Meier S, Rhodes F, et al. 2007. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(9):4022–4032. doi:10.3168/jds.2006-852.

Cheong S, Sá Filho O, Absalón-Medina V, Pelton S, Butler R, Gilbert R. 2016. Metabolic and endocrine differences between dairy cows that do or do not ovulate first postpartum dominant follicles. *Biol Reprod.* 94(1):1–11. doi:10.1095/biolreprod.114.127076.

Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 109(8):828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.

Colazo M, Ambrose D, Kastelic J, Small J. 2008. Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 72(1):32–36.

Colazo M, Hayirli A, Doepel L, Ambrose D. 2009. Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. *J Dairy Sci.* 92(6):2562–2571. doi:10.3168/jds.2008-1517.

Crowe M. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. In: *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 43. p. 20–28.

Crowe M, Diskin M, Williams E. 2014. Parturition to resumption of ovarian cyclicity: Comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal.* 8(SUPPL. 1):40–53. doi:10.1017/S1751731114000251.

Crowe M, Padmanabhan V, Mihm M, Beitins L, Roche F. 1998. Resumption of Follicular Waves in Beef Cows Is Not Associated with Periparturient Changes in Follicle-Stimulating Hormone Heterogeneity Despite Major Changes in Steroid and Luteinizing Hormone Concentrations. *Biol Reprod.* 58(6):1445–1450. doi:10.1095/biolreprod58.6.1445. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/58/6/1445/2761171>.

Dadarwal D, Palmer C. 2021. Postpartum Uterine Infection. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 639-654

Darwash A, Lamming G, Woolliams J. 1997. Estimation of Genetic Variation in the Interval from Calving to Postpartum Ovulation of Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 80(6):1227–1234. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76051-X.

Deckelbaum R, Worgall T, Seo T. 2006. n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr.* 83(6 Suppl):1520–1525. doi:10.1093/ajcn/83.6.1520S.

Ferguson J, Galligan D, Thomsen N. 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J Dairy Sci.* 77(9):2695–2703. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X.

Fodor I, Gábor G, Lang Z, Abonyi-Tóth Z, Ózsvári L. 2019. Relationship between reproductive management practices and fertility in primiparous and multiparous dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 83(3):218–227.

Folnožić I, Turk R, Đuričić D, Vince S, Flegar-Meštrić Z, Sobiech P, Lojkić M, Valpotić H, Samardžija M. 2016. The effect of parity on metabolic profile and resumption of ovarian cyclicity in dairy cows. *Veterinary Archives.* 86(5):641–653.

Fonseca F, Britt J, McDaniel B, Wilk J, Rakes A. 1983. Reproductive Traits of Holsteins and Jerseys. Effects of Age, Milk Yield, and Clinical Abnormalities on Involution of Cervix and Uterus, Ovulation, Estrous Cycles, Detection of Estrus, Conception Rate, and Days Open. *J Dairy Sci.* 66(5):1128–1147. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)81910-9.

Friggens N, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard I, Ingvarsen K, Løvendahl P, Jensen J. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence of genetically driven body energy change. *J Dairy Sci.* 90(11):5291–5305. doi:10.3168/jds.2007-0173.

Gautam G, Nakao T, Yamada K, Yoshida C. 2010. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology.* 73(2):180–189. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.08.011.

Gilbert R, Santos N. 2016. Dynamics of postpartum endometrial cytology and bacteriology and their relationship to fertility in dairy cows. *Theriogenology.* 85(8):1367–1374. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.10.045.

Gilbert R, Shin S, Guard C, Erb H, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* 64(9):1879–1888. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.022.

Gohar M, Elmetwally M, Montaser A, Zaabel S. 2018. Effect of Oxytetracycline Treatment on Postpartum Reproductive Performance in Dairy Buffalo-Cows with Retained Placenta in Egypt. *Journal of Veterinary Healthcare.* 1(3):45–53. doi:10.14302/issn.2575-1212.jvhc-18-2146.

Hansen PJ. 2021. Compromised Pregnancy Success Caused by Heat Stress. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction.* 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 814-829

Heinze G, Dunkler D. 2017. Five myths about variable selection. *Transplant International.* 30(1):6–10. doi:10.1111/tri.12895.

Jenkins TC. 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *J Dairy Sci.* 76(12):3851–3863. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9.

Kadivar A, Ahmadi MR, Vatankhah M. 2014. Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Trop Anim Health Prod.* 46(1):121–126. doi:10.1007/s11250-013-0461-9.

Kadokawa H, Blache D, Martin GB. 2006. Plasma leptin concentrations correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum Holstein cows. *J Dairy Sci.* 89(8):3020–3027. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72575-9.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 62(1–2):9–23. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.03.001.

Klopfenstein JJ. 2019. Dairy Herd Health for Optimal Reproduction. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 517-525

Lamming G, Foster J, Bulman D. 1979. Pharmacological control of reproduction cycles. *Veterinary Record.* 104(8):156–160. doi:https://doi.org/10.1136/vr.104.8.156.

LeBlanc S, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe G, Walton J, Johnson W. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85(9):2223–2236. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74302-6.

Lucy M. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci.* 84(6):1277–1293. doi:10.3168/jds.s0022-0302(01)70158-0.

Martin J, Vonnahme K, Adams D, Lardy G, Funston R. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J Anim Sci.* 85(3):841–847. doi:10.2527/jas.2006-337.

Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod.* 5(1):38–45.

McArt J, Nydam D, Oetzel G. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.* 95(9):5056–5066. doi:10.3168/jds.2012-5443

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA and Wilkinson RG. 2011. *Animal Nutrition*. 7th ed. Harlow (UK): Prentice Hall/Pearson.

McNamara JP, Shields SL. 2013. Reproduction during lactation of dairy cattle: Integrating nutritional aspects of reproductive control in a systems research approach. *Animal Frontiers.* 3(4):76–83. doi:10.2527/af.2013-0037.

McNamara S, Butler T, Ryan DP, Mee JF, Dillon P, O'Mara FP, Butler ST, Anglesey D, Rath M, Murphy JJ. 2003. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci.* 79(1–2):45–56. doi:10.1016/S0378-4320(03)00111-8.

Mekuriaw Y. 2023. Negative energy balance and its implication on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows: review paper. *J Appl Anim Res.* 51(1):220–229. doi:10.1080/09712119.2023.2176859.

Melendez P, Redrovan D, Chelikani PK. 2024. Association between body condition score and abdominal fat assessed by ultrasound in Jersey cows. *Vet Med Sci.* 10(5). doi:10.1002/vms3.1515.

Moallem U. 2018. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 101(10):8641–8661. doi:10.3168/jds.2018-14772.

Moore K, Thatcher WW. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 89(4):1254–1266. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-4.

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 84(7):1646–1659. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74600-0.

Mulligan F, O'Grady L, Rice D, Doherty M. 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim Reprod Sci.* 96(3–4):331–353. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.08.011.

Noakes DE. 2019. Physiology of the Puerperium. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 10th ed. [place unknown]: Elsevier. p. 148-156

Opsomer G, Gröhn Y, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology.* 53(4):841–857. doi:doi: 10.1016/S0093-691X(00)00234-X.

Ospina PA, Nydam D V., Stokol T, Overton TR. 2010. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J Dairy Sci.* 93(8):3595–3601. doi:10.3168/jds.2010-3074.

Otto J, Freeman M, Malau-Aduli B, Nichols P, Lane P, Malau-Aduli A. 2014. Reproduction and Fertility Parameters of Dairy Cows Supplemented with Omega-3 Fatty Acid-rich Canola Oil. *Annu Res Rev Biol.* 4(10):1611–1636. doi:10.9734/ARRB/2014/7689.

Parkinson TJ. 2019. Infertility in the Cow Due to Functional and Management Deficiencies. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 10th ed. [place unknown]: Elsevier. p. 361-407

Pascottini O, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. 2016. Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology.* 86(6):1550–1556. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.05.014.

Pascottini O, LeBlanc S. 2020. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology.* 150:193–200. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.01.042.

Pereira G, Bexiga R, E Silva JC, Silva E, Ramé C, Dupont J, Guo Y, Humblot P, Lopes-Da-Costa L. 2020. Adipokines as biomarkers of postpartum subclinical endometritis in dairy cows. *Reproduction*. 160(3):417–430. doi:10.1530/REP-20-0183.

Pereira G, Simões P, Bexiga R, Silva E, Mateus L, Fernandes T, Alves SP, Bessa RJB, Lopes-da-Costa L. 2022. Effects of feeding rumen-protected linseed fat to postpartum dairy cows on plasma n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations and metabolic and reproductive parameters. *J Dairy Sci*. 105(1):361–374. doi:10.3168/jds.2021-20674.

Peter A, Vos P, Ambrose D. 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*. 71(9):1333–1342. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.012.

Petersson KJ, Gustafsson H, Strandberg E, Berglund B. 2006. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *J Dairy Sci*. 89(7):2529–2538. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72328-1.

Petit H, Benchaar C. 2007. Milk production, milk composition, blood composition, and conception rate of transition dairy cows fed different profiles of fatty acids. *Can J Anim Sci*. 87(4). doi:10.4141/CJAS07027.

Pickett M, Piepenbrink M, Overton T. 2003. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci*. 86(6):2113–2121. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73801-6.

Pohler GK, Fernández L, Poole RK, Reese ST and Franco G. 2021. Managing the “Problem Donor”. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 1110-1123

Porto Editora. (2024, abril 20). *Dicionário Infopédia de Termos Médicos*. Dicionário Infopédia de Termos Médicos.

Pushpakumara P, Gardner N, Reynolds C, Beever D, Wathes D. 2003. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 60(6):1165–1185. doi:10.1016/S0093-691X(03)00119-5.

Roche JF. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci*. 96(3–4):282–296. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.08.007.

Roche J, Friggens N, Kay J, Fisher M, Stafford K, Berry D. 2009. Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci*. 92(12):5769–5801. doi:10.3168/jds.2009-2431.

Roche JR, Kay JK, Friggens NC, Looor JJ, Berry DP. 2013. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 29(2):323–336. doi:10.1016/j.cvfa.2013.03.003.

Rodney RM, Celi P, Scott W, Breinhild K, Lean IJ. 2015. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci*. 98(8):5601–5620. doi:10.3168/jds.2015-9528.

Rosales E, Ametaj B. 2021. Reproductive Tract Infections in Dairy Cows: Can Probiotics Curb Down the Incidence Rate? *Dairy*. 2(1):40–64. doi:10.3390/dairy2010004.

Santos J, Juchem S, Cerri R, Galvão K, Chebel R, Thatcher W, Dei C, Bilby C. 2004. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 87(4):868–881. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73231-2.

Schlafer P and Foster R. 2016. Inflammatory diseases of the uterus. In: Grant M. editor. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6<sup>th</sup> ed. St. Louis, MI: Elsevier. p. 387–393.

Senatore E, Butler W, Oltenacu P. 1996. Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *Animal Science*. 62(1):17–23. doi:10.1017/S1357729800014260.

Senger PL. 2012. *Pathways to pregnancy and parturition*. 3rd ed. Redmond (OR): Current Conceptions, Inc.

Sheldon IM, Noakes D, Rycroft A, Pfeiffer D, Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. 123(6):837–845.

Sheldon IM. 2004. The postpartum uterus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 20(3 SPEC. ISS.):569–591. doi:10.1016/j.cvfa.2004.06.008.

Sheldon IM. 2019. The Metritis Complex in Cattle. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th ed. [place unknown]: Elsevier. p. 408-433

Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. 2019. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Annu Rev Anim Biosci*. 7:361–384. doi:10.1146/annurev-animal-020518-115227.

Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. In: *Animal Reproduction Science*. Vol. 82–83. p. 295–306.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 65(8):1516–1530. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.021.

Shin EK, Jeong JK, Choi IS, Kang HG, Hur TY, Jung YH, Kim IH. 2015. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. *Theriogenology*. 84(2):252–260. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.03.014.

Short R, Bellows R, Staigmiller R, Berardinelli J, Custep E. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci*. 68(3):799–816. doi:10.2527/1990.683799x.

Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Akita M, Higaki T. 2005. Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing

dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology*. 64(4):855–866. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.12.007.

Silvestre F, Carvalho T, Francisco N, Santos J, Staples C, Jenkins T, Thatcher W. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. *J Dairy Sci*. 94(1):189–204. doi:10.3168/jds.2010-3370.

Smith JD. 2021. Cystic Ovarian Follicles. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 399-407

Sordillo LM. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci*. 99(6):4967–4982. doi:10.3168/jds.2015-10354.

Sordillo L, Contreras G, Aitken S. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev*. 10(1):53–63. doi:10.1017/S1466252309990016.

Staples C, Burke J, Thatcher W. 1998. Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *J Dairy Sci*. 81(3):856–871. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.

Tanaka T, Arai M, Ohtani S, Uemura S, Kuroiwa T, Kim S, Kamomae H. 2008. Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 108(1–2):134–143. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.07.013.

Taylor V, Beever D, Bryant M, Wathes DC. 2003. Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. *Theriogenology*. 59(7):1661–1677. doi:10.1016/s0093-691x(02)01225-6.

Taylor V, Beever D, Wathes D. 2004. Physiological Adaptations to Milk Production that Affect the Fertility of High Yielding Dairy Cows. *BSAP Occasional Publication*. 29:37–71. doi:10.1017/s0263967x00040040.

Thatcher W, Wilcox C. 1973. Postpartum Estrus as an Indicator of Reproductive Status in the Dairy Cow. *J Dairy Sci*. 56(5):608–610. doi:10.3168/jds.S0022-0302(73)85227-0.

Walsh R, Walton J, Kelton D, LeBlanc S, Leslie K, Duffield T. 2007. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*. 90(6):2788–2796. doi:10.3168/jds.2006-560.

Wathes D, Cheng Z, Bourne N, Taylor V, Coffey M, Brotherstone S. 2007. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest Anim Endocrinol*. 33(2):203–225. doi:10.1016/j.domaniend.2006.05.004.

Williams E, Fischer D, Noakes D, England G, Rycroft A, Dobson H, Sheldon I. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*. 68(4):549–559. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.056.

Williams E, Fischer D, Pfeiffer D, England G, Noakes D, Dobson H, Sheldon IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection

and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 63(1):102–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.017.

Zachut M, Arieli A, Moallem U. 2011. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. *Reproduction*. 141(6):833–840. doi:10.1530/REP-10-0518.

Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, Livshitz L, Yakoby S, Moallem U. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J Dairy Sci*. 93(2):529–545. doi:10.3168/jds.2009-2167.

## Anexos

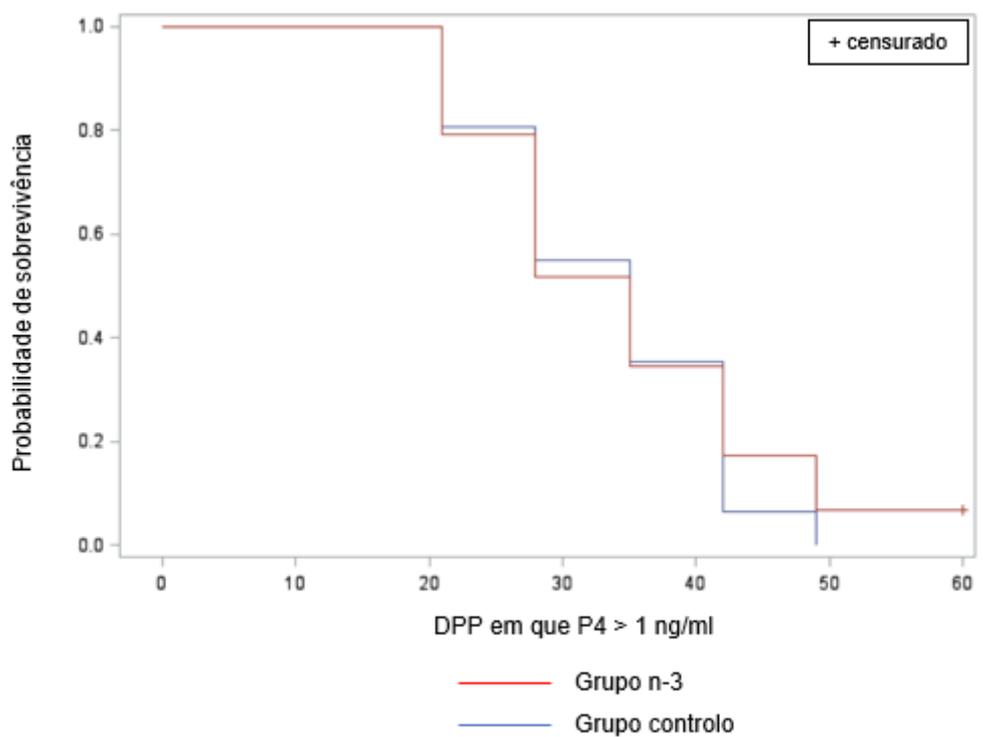
### Anexo 1 - Ingredientes e concentrações de nutrientes constituintes da TMR e dos suplementos de gordura fornecidos aos animais em estudo

	TMR	Suplemento de gordura	
		Controlo	AGPI n-3
<b>Ingredientes (% de MS)</b>			
Silagem de milho	29,1	–	–
Feno de azevém	12,6	–	–
Grão de cevada	27,8	–	–
Levedura de cerveja	2,1	–	–
Farinha de soja	13,9	–	–
Melaço de beterraba	3,0	–	–
Farelo de arroz	3,5	–	–
Farinha de palmiste	3,9	–	–
Ácido palmítico 98%	1,1	–	–
<i>Premix</i> de minerais e vitaminas	2,9	–	–
<b>Concentração de nutrientes (% de MS)</b>			
% MS	51,6	90,7	91
PB	16,9	14,4	13,5
GB	4,3	15,6	14,6
Amido	26,4	18,4	20,6
FDN	32,5	21,4	20
FDA	18,9	–	–
LDA	2,9	–	–
Cinzas	8,6	10,2	11,4
<b>Ácidos gordos (g/100g do total de AG)</b>			
14:0	0,91	1,5	0,1
16:0	43,4	46,5	5,3
18:0	3,63	47,5	30,8
18:1 <i>cis</i> -9	17,8	4,5	11,8
18:1 <i>cis</i> -11	1,38	–	0,4
18:2 n-6	28,5	–	10,5
18:3 n-3	3,32	–	40
20:0	0,38	–	0,6
Outros	0,59	–	0,5

**Anexo 2 - Valores da ingestão total de suplemento (em kg) de cada animal durante as nove semanas de estudo**

	Suplemento ingerido (kg)	
	Grupo n-3 (n=29)	Grupo controlo (n=31)
Animal nº1	51,5	1,7
Animal nº2	8,2	28,4
Animal nº3	69,7	0,5
Animal nº4	3,4	6,3
Animal nº5	53,6	1,8
Animal nº6	65,2	18,5
Animal nº7	0	39,7
Animal nº8	20,9	21,2
Animal nº9	62,1	36,5
Animal nº10	71,9	23,4
Animal nº11	55,4	43,6
Animal nº12	28,1	42,5
Animal nº13	15,9	9,2
Animal nº14	28,7	25,4
Animal nº15	59,7	11,4
Animal nº16	71,7	15,4
Animal nº17	72,4	11,7
Animal nº18	35,4	12,1
Animal nº19	51,2	12,7
Animal nº20	4,3	35,5
Animal nº21	1,1	19,7
Animal nº22	35,7	5,5
Animal nº23	2,1	1,0
Animal nº24	44,9	9,4
Animal nº25	25,5	19,1
Animal nº26	1,6	7,5
Animal nº27	1,7	21,6
Animal nº28	9,1	18,5
Animal nº29	12,7	25,9
Animal nº30	–	2,9
Animal nº31	–	20,7
Total	963,7	549,3
$\bar{X} \pm s$	33,2 ± 26,1	17,7 ± 12,5

**Anexo 3 - Curvas de Kaplan Meyer onde se comparam os dois grupos, n-3 e controlo, e o tempo, em dias, que decorre entre o parto e a primeira ovulação**



# Factsheet

# D.

## Body Condition Scoring (BCS) using the Penn State University method

### What is Body Condition Scoring (BCS)?

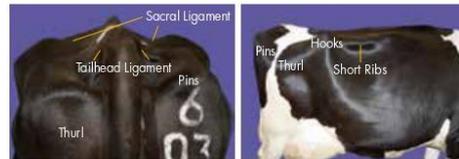
BCS was developed around 20 years ago and is widely accepted as a practical means of assessing the impact of negative energy balance in early lactation.

This system concentrates on the accurate determination of scores between 2.0 and 4.0 as these are the most critical for management decisions. Scores outside these values are extreme, those below 2.0 are seriously under-conditioned and require immediate attention as do those at 4.0 and above which require controlled weight loss.

Scores range from 1 to 5 in increments of 0.25.

This system concentrates on accurately assigning scores from 2.0 to 4.0.

Scorers using this system will be able to assign BCS consistently and accurately.



### When to Condition Score

The change in Body Condition Score is more important than the absolute value, therefore scoring should be undertaken regularly. A good routine involves scoring:

Stage of lactation	Target BCS
At calving	2.5 - 3.0
60 days post-calving	2.0 - 2.5
100 days before drying off	2.5 - 3.0
At drying off	2.5 - 3.0

Further information on how to Body Condition Score can be found on the DairyCo website, including a short training video.

### Step 1



V - angle BCS less than or equal to 3 follow the **YELLOW** steps

Assess the angle between the hooks and pins.

- The first decision you make will divide cows into two groups: those with a BCS less than or equal to 3 and those with a BCS greater than 3.
- This decision may be the most difficult one in the BCS process, especially if the cow is near a 3.0 or 3.25 BCS.



U - angle BCS greater than 3 follow the **GREY** steps

#### Step 2 (BCS less than or equal to 3)

Standing at the rear of the cow, assess whether the hooks are rounded or angular.



Rounded Hooks  
• BCS = 3.0



Angular Hooks  
• BCS = 2.75 or less

#### Step 2 (BCS greater than 3)

Standing at the rear of the cow, assess whether both the sacral and tailhead ligaments are fully visible.



Sacral Visible  
Tailhead Visible  
• Both ligaments easily seen  
• BCS = 3.25

### Step 3

Refine the score '2.75 or less' by evaluating the PINS.



Padded Pins

- BCS = 2.75

### Step 4

Now we need to feel the pins to assess the presence of a palpable fat pad (one that is not visible to the eye but can be felt) to refine the score of '2.5 or less'.



Palpable Fat Pad on Pins

- Fat pad present
- BCS = 2.5

No Fat Pad on Pins

- No fat pad
- BCS = 2.25 or less

### Step 5

Evaluate the visibility of the short ribs.

- Look for the bony ridges of the short ribs.
- Estimate the distance that these ridges are easily seen from the tip of the short ribs to the spine.
- Are the ridges visible half of the distance, three-quarters of the distance, more?



Visible  $\frac{1}{2}$  the distance

- Ribs visible halfway to the spine
- BCS = 2.25

Visible  $\frac{3}{4}$  the distance

- Ribs visible  $\frac{3}{4}$  of the distance of the spine
- BCS = 2.0

### Step 6

Cows with sawtooth spine and ribs are severely under-conditioned and will score less than 2.0.

### Step 3

Continue to assess the visibility of the ligaments. The tailhead ligament will become covered in fat first.



Sacral Visible

Tailhead Barely Visible

- Tailhead ligament partly covered in fat
- BCS = 3.50

### Step 4

The tailhead is now completely covered. Assess the visibility of the sacral ligament to determine the score of 3.75 or 4.0 or more.



Sacral Barely Visible

Tailhead Not Visible

- Neither ligament easily seen
- BCS = 3.75

Sacral Not Visible

Tailhead Not Visible

- Neither ligament visible
- Will score 4.0 or more



All bony prominences rounded and covered in fat

- Tailhead buried in fat
- Fat deposits readily seen on rump and legs
- BCS = 5