UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR E DA CONDIÇÃO CORPORAL SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS *BOS INDICUS* SUJEITAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

GONÇALO MORAIS SALVADOR TELES DA ROSA

ORIENTADOR
Doutor Ed Hoffmann Madureira

CO-ORIENTADOR
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus
Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2015

LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR E DA CONDIÇÃO CORPORAL SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS *BOS INDICUS* SUJEITAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

GONÇALO MORAIS SALVADOR TELES DA ROSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus
Doutor Rui José Branquinho de Bessa
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR
Doutor Ed Hoffmann Madureira

CO-ORIENTADOR
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2015

LISBOA

“**A dúvida é o princípio da sabedoria.”**

Aristóteles

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio incondicional oferecido durante esta caminhada. Pai, o meu conselheiro; Mãe, a minha força motriz.

Ao meu irmão, pelo seu companheirismo.

À Raquel, pelo seu amor e amizade.

E a todos os outros familiares, em especial ao Francisco e à Avó Cândida.

AGRADECIMENTOS

Após conclusão do trabalho de mestrado, quero agradecer a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a sua realização, em especial:

Ao Professor Doutor Ed Hoffmann Madureira, por ter aceitado a orientação do estágio curricular e pela sua disponibilidade em me receber em território brasileiro. Pela sua simpatia e pelo seu conhecimento transmitido durante o período de estágio.

Ao Professor Doutor João Nestor das Chagas e Silva, por ter aceitado a co-orientação do meu estágio curricular, pela disponibilidade oferecida na transmissão do conhecimento teórico e prático e na correcção do presente trabalho, pela paciência despendida para esclarecimento das minhas dúvidas e indecisões, pelo fornecimento de documentação fundamental para a elaboração desta dissertação, pela sua verdadeira amizade e pelos momentos de descontracção e lazer partilhados. Um brinde a tudo isso!

Ao Dr. Rui Silva, por me ter proporcionado um belíssimo estágio extracurricular, pela sua disponibilidade em me receber e por me transmitir o seu vastíssimo conhecimento teórico e prático na área da buiatria, pela sua amizade e pelos seus conselhos. Um verdadeiro homem da buiatria.

Ao Doutor Milton, pelo supervisionamento dos trabalhos efectuados durante o estágio curricular, pela sua enorme paciência e pela sua preciosa ajuda no tratamento estatístico.

A todos os membros do VRA: Kléber, Agustin, Thiago, Alan, Rómulo, Tânia, Letícia e Guilherme, pela amizade, pelo companheirismo, pelos bons momentos vividos e pela partilha de experiências e conhecimentos. Obrigado a todos!

Ao meu colega de estágio Pedro Esteves, pelo apoio incondicional durante o estágio e pela sua camaradagem.

A todos os meus colegas de curso que tornaram estes 6 anos inesquecíveis. Em especial aos que vieram dos Açores: Diogo Branco, Francisco Lopes, Rui Oliveira, Nuno Siqueira, Raquel Barros, Susana Ferreira, Eliana Silva, Andreia Neves, Nádia Cabral por todos os momentos vividos, pela amizade, companheirismo e disponibilidade, principalmente nos momentos mais difíceis. Também à Rita Serrenho, Inês Alves, João Lima e à minha madrinha Carolina Saraiva.

A todos os professores intervenientes no meu percurso académico, pela transmissão do conhecimento.

À minha família, em especial ao meu Pai, Mãe e Irmão, por terem contribuído para a minha educação e formação e por me permitirem realizar este sonho. Sem vocês nada disto seria possível.

À Raquel, minha namorada, pela compreensão, dedicação e pelo apoio e estabilidade emocional.

Efeito do Diâmetro Folicular e da Condição Corporal sobre a Taxa de Gestação em vacas *Bos indicus* sujeitas a programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo

RESUMO

Diversos estudos indicam que o tamanho do folículo pré-ovulatório (FPO) no momento da inseminação influencia de forma significativa as taxas de gestação (TG) e a mortalidade embrionária/fetal, em vacas no pós-parto sujeitas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para além disso, nos bovinos, o *status* de energia, particularmente o balanço energético negativo (BEN), tem uma grande influência no desempenho reprodutivo dos mesmos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objectivo determinar e compreender a relação existente entre o diâmetro do FPO e os efeitos da condição corporal (CC) sobre a TG, em bovinos *Bos indicus* (n=376) sujeitos a um programa de IATF. O protocolo utilizado consistiu num protocolo de 3 maneios [Dia 0 (D0) - 2 mg de benzoato de E_2 (BE) + dispositivo intravaginal (DIV) com 0,7 g de progesterona (P_4); Dia 8 ou D8,5 (D8/8,5) - remoção do DIV de P_4 + 1 mg de BE + 0,150 mg de D-cloprostenol ($PGF_{2\alpha}$) + 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG); Dia 9,5 ou D10 (D9,5/10) – IATF]. O diâmetro do FPO (D9,5/10) e a gestação (DG30, DG60, DG100) foram determinados por ultra-sonografia. O *score* de condição corporal (SCC) foi obtido ao D0 e o cio foi diagnosticado ao D9,5/10, pelo método de pintura da base da cauda. O diâmetro médio do FPO no dia da IATF foi de 15,16 mm. A taxa de gestação média ao DG30, DG60 e DG100 foi, respectivamente, 60,11%, 55,05% e 82,71%. As vacas que apresentaram no dia da IATF FPO de diâmetro superior a 15 mm tiveram uma TG ao DG30 (68,33% vs. 52,55%; p=0,008), DG60 (63,33% vs. 47,45%; p=0,001) e DG100 (85,71% vs. 79,90; p=0,03) estatisticamente superior àquelas com um diâmetro entre os 8,5-15 mm. Em relação ao SCC, as vacas com um SCC ≥5 tiveram uma TG estatisticamente superior ao DG30 (60,94% vs. 55,36%; p=0,05) e DG60 (56,25% vs. 48,21%; p=0,04) em comparação com as de SCC <5. A TG em relação à categoria das fêmeas (primípara vs. multípara), embora sempre superior nas multíparas, apenas ao DG100, revelou um valor com significância estatística (88,42% vs. 64,84%; p=0,01). A perda embrionária foi inferior nos animais com um FPO >15 mm (7,32% vs. 9,71%; p=0,44), nos animais com um SCC ≥5 (7,69% vs. 12,90; p=0,17) e nas fêmeas multíparas (7,43% vs. 11,76%; p=0,65), no entanto, nenhum desses valores revelou significância estatística.

Em conclusão, o diâmetro folicular na altura da IATF e a CC dos animais ao início do protocolo revelaram um efeito estatisticamente significativo na TG de fêmeas *Bos indicus,* sujeitas a um programa de IATF com P_4 e E_2.

Palavras – chave: Diâmetro folicular; Condição corporal; Taxa de gestação; *Bos indicus*; Inseminação artificial em tempo fixo.

Effect of follicular diameter and body condition on the pregnancy rate in *Bos indicus* cows submitted to a Fixed Time Artificial Insemination program

ABSTRACT

Several studies indicate that the size of the pre-ovulatory follicle (POF) at the time of insemination, significantly influences the pregnancy rates (PR) and embryo/fetal mortality in cows subjected to fixed-time artificial insemination protocol (FTAI) after calving. Furthermore, in cattle, the energy status, particularly the negative energy balance (NEB), has a great influence on their reproductive performance. Thus, this study aimed to determine and understand the relationship between the diameter of the POF and the effects of body condition (BC) on the PR in Bos indicus cattle (n = 376) subject to a FTAI program. The protocol used was a 3 protocol managements [Day 0 (D0) - 2 mg of estradiol (E_2) benzoate (EB) + intravaginal device (IVD) with 0.7 g of progesterone (P_4); Day 8 or D8.5 (D8/8.5) - IVD removal + 1 mg of EB + 0.150 mg of D-cloprostenol ($PGF_{2\alpha}$) + 300 IU equine chorionic gonadotropin (eCG); Day 9.5 or D10 (D9.5/10) – FTAI]. The diameter of the POF (D9.5/10) and the pregnancy (DG30, DG60 and DG100) were determined by ultrasound. The body condition score (BCS) was obtained at D0 and the heat was diagnosed at D9.5/10, by the method of tail-head paint. The average diameter of the POF on the FTAI was 15.16 mm. The average PR at DG30, DG60 and DG100 was respectively 60.11%, 55.05% and 82.71%. The cows who showed at the FTAI day, POF greater than 15 mm, had a PR at DG30 (68.33% vs. 52.55%, P = 0.008), DG60 (63.33% vs. 47.45%; p = 0.001) and DG100 (85.71% vs. 79.90; p = 0.03) statistically higher, than those with a diameter between 8.5 to 15 mm. Regarding the BCS, animals with a BCS ≥5 had a PR statistically superior at DG30 (60.94% vs. 55.36%; p = 0.05) and DG60 (56.25% vs. 48.21%, P = 0.04) compared with the animals BCS <5. The PR in relation to females category (primiparous vs. multiparous), although always higher at the multiparous, only at DG100, revealed a value with statistical significance (88.42% vs. 64.84%, p = 0.01). The embryonic loss was lower in animals with a POF >15 mm (7.32% vs. 9.71%, p = 0.44), animals with a BCS ≥5 (7.69% vs. 12.90; p = 0.17) and the multiparous females (7.43% vs. 11.76%, P = 0.65), however, none of those values showed statistical significance.

In conclusion, the follicular diameter at the FTAI moment and the BC of the animals at the beginning of protocol revealed a statistically significant effect on PR female *Bos indicus* submitted to a FTAI program.

Keywords: Follicular diameter; Body condition; Pregnancy rate; *Bos indicus*; Fixed-time artificial insemination.

Índice Geral

RESUMO IV

ABSTRACT V

ÍNDICE DE FIGURAS X

ÍNDICE DE TABELAS XI

ÍNDICE DE GRÁFICOS XII

ÍNDICE DE ABREVIATURAS XIII

INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS 1

RELATÓRIO DE ESTÁGIO 3

a. FMV – Lisboa 3

b. Pirassununga – São Paulo (Brasil) 3

c. São Teotónio (Litoral Alentejano) 5

I. GENERALIDADES SOBRE O CICLO ÉSTRICO BOVINO 7

1.1. O Ciclo Éstrico Bovino 8

1.1.1. Regulação neuro-endócrina do ciclo éstrico bovino 9

1.1.2. Dinâmica folicular 13

1.1.3. A ovulação 17

1.1.4. Formação do CL e o processo de luteólise 18

1.2. Diferenças de Fisiologia Reprodutiva entre *Bos indicus e Bos taurus* 19

1.2.1. Puberdade 20

1.2.2. Ciclo éstrico e dinâmica folicular 20

1.2.3. Desvio folicular e selecção do folículo dominante 21

1.2.4. Aquisição da capacidade ovulatória 22

1.2.5. O tamanho máximo do folículo ovulatório/dominante e do CL 22

1.2.6. Hormonas circulantes 23

1.2.7. Comportamento éstrico 24

1.2.8. Pós-parto 24

II. O DIÂMETRO FOLICULAR E A SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE GESTAÇÃO 26

2.1. Produção de Estradiol pelo Folículo em Crescimento e seus Efeitos 27

2.2. Reconhecimento Materno da Gestação 28

2.3. A Importância do Diâmetro Folicular 30
2.3.1. O ambiente uterino peri-ovulatório 31
2.3.1.1. O Estradiol 32
2.3.1.2. A Progesterona 34
III. A CONDIÇÃO CORPORAL E A SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE GESTAÇÃO 36
3.1. Introdução 37
3.2. Nutrição e Reprodução da fêmea bovina 38
3.2.1. Priorização da energia 38
3.2.2. Exigências nutricionais das vacas de carne 38
3.2.2.1. Nutrição no pré-parto 39
3.2.2.2. Nutrição ao Parto 39
3.2.2.3. Nutrição no pós-parto 40
3.2.2.4. Suplementação proteica, lipídica e mineralo-vitamínica 40
3.3. Avaliação da condição corporal em bovinos de carne 41
3.3.1. A pontuação da Condição Corporal 42
3.4. Como a Condição Corporal interfere na taxa de gestação 43
3.4.1. Hormonas e metabolitos intervenientes 46
3.4.1.1. Hormona do crescimento (GH) 46
3.4.1.2. Factor de crescimento semelhante à Insulina (IGF-1) 47
3.4.1.3. Insulina 48
3.4.1.4. Leptina 49
3.4.1.5. Neuropeptídeo Y (NPY) 49
3.4.1.6. Glucose 50
3.4.1.7. Ácidos gordos não-esterificados (AGNE) 51
IV. CONTROLO FARMACOLÓGICO DO CICLO ÉSTRICO 52
4.1. Introdução 53
4.2. Emergência de nova Onda Folicular 54
4.2.1. GnRH (Gonadoliberina) 55
4.2.2. Estradiol 56
4.3. Controlo da Vida Útil do Corpo Lúteo 56

4.3.1. Redução da fase lútea 56
4.3.1.1. $PGF_{2\alpha}$ 57
4.3.2. Alongamento/simulação da fase lútea 58
4.3.2.1. Progesterona (P_4) 59
4.4. Indução da Ovulação 60
4.5. Protocolos de Sincronização do Estro 60
4.6. Protocolos de Sincronização da Ovulação 62
4.6.1. *Ovsynch* 63
4.6.2. Modificações do *Ovsynch* 64
4.6.2.1. Pré-sincronização (Protocolo *Pre-Synch*) 65
4.6.2.2. Co-sincronização (Protocolo *Co-Synch*) 66
4.6.2.3. Sincronização selectiva (Protocolo *Select-Synch*) 66
4.6.2.4. Protocolo *Ovsynch* associado à progesterona (*Ovsynch* + CIDR) 66
4.6.2.5. Protocolo *Heat-Synch* 68
4.6.2.6. Protocolo *Double-Synch* 68
4.7. Manipulação do Desenvolvimento Folicular em Bovinos *Bos indicus* 69
V. TRABALHO EXPERIMENTAL 73
5.1. Introdução 74
5.2. Material e Métodos 75
5.2.1. Caracterização da exploração e dos animais utilizados 75
5.2.2. Protocolo de Sincronização 75
5.2.3. Ultrassonografia e detecção dos cios 76
5.2.4. Diagnóstico de Gestação 77
5.2.5. Registo de dados e análise estatística 77
5.3. Resultados 78
5.3.1. Taxa de Gestação ao DG30 79
5.3.2. Taxa de Gestação ao DG60 81
5.3.3. Taxa de Gestação Final (DG100) 83
5.2. Discussão 84
5.3. Conclusão 89

BIBLIOGRAFIA **90**

ANEXOS **98**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - O Ciclo éstrico bovino. Morfologia do Corpo Lúteo e o perfil da Progesterona plasmática. Retirado de Ribeiro (2015). 9
Figura 2 - Controlo neuro-endócrino do ciclo éstrico bovino. Retirado de Ribeiro (2015). 9
Figura 3 - Diagrama esquemático da população folicular em bovinos. Retirado de Kanitz (2003). 13
Figura 4 - Ciclo éstrico bovino com duas (superior) ou três ondas (inferior) de desenvolvimento folicular. Retirado de Adams & Singh (2015). 14
Figura 5 - Ciclo éstrico bovino de três ondas foliculares e respectiva variação hormonal. Retirado de Ribeiro (2015). 15
Figura 6 - Modelo de produção de Estradiol (*two cells* / *two gonadotrophins*) pelas células da teca e da granulosa. Retirado de Stevenson (2007). 27
Figura 7 - Efeito do estado de desenvolvimento folicular sobre o tempo entre a administração de $PGF_{2\alpha}$ e a exibição do cio, em bovinos. Adaptado de Lane et al. (2008). . 58
Figura 8 - Representação esquemática de protocolos baseados no uso exclusivo da $PGF_{2\alpha}$, para a sincronização do estro em bovinos. Adaptado de Cavalieri et al. (2006). 61
Figura 9 - Representação esquemática de 3 diferentes protocolos de sincronização do estro utilizando-se a P_4. Adaptado de Lane et al. (2008). 62
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo *Ovsynch*. Retirado de Fricke et al (1998). 63
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo *Pre-Synch*. Retirado de Fricke, n.d. . 65
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo *Co-Synch*. Retirado de Fricke, n.d. . 66
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo *Select-Synch*. Adaptado de Raposo (2013). 66
Figura 14 - Representação esquemática do protocolo *Ovsynch* + CIDR. Retirado de Fricke, n.d. 67
Figura 15 - Representação esquemática do protocolo *Co-Synch* + 5d CIDR. Retirado de Kasimanickam (2015b). 67
Figura 16 - Representação esquemática do protocolo *Heat-Synch*. Retirado de Fricke, n.d. 68
Figura 17 - Representação esquemática do protocolo *Double-Synch*. Adaptado de Raposo (2013). 68
Figura 18 - Protocolo de Sincronização da Ovulação utilizado durante o trabalho experimental. 76
Figura 19 - Procedimento utilizado para o diagnóstico de gestação durante o trabalho experimental. Original do Autor. 77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das actividades desenvolvidas na segunda fase do estágio. 4
Tabela 2 - Resumo das actividades desenvolvidas na terceira fase do estágio. 5
Tabela 3 - Principais diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus.* 25
Tabela 4 - *Score* da Condição Corporal de bovinos de carne (1-9). Adaptado de Machado, Corrêa et al. (2008). 42
Tabela 5 - Animais utilizados durante o trabalho experimental. 75
Tabela 6 - Efeito dos 3 modelos estudados (diâmetro do FD à IATF; SCC no inicio do protocolo; categoria dos animais) sobre alguns dados ováricos. 79

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxa de ciclicidade ao início do protocolo de IATF (D0), de acordo com o SCC. 78
Gráfico 2 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com o diâmetro do FD à IATF. 79
Gráfico 3 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com o SCC. 80
Gráfico 4 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com a categoria dos animais. 80
Gráfico 5 - Taxa de ciclicidade das vacas ressincronizadas ao DG30 de acordo com o seu SCC. 81
Gráfico 6 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com o diâmetro do FD à IATF. 82
Gráfico 7 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com o SCC. 82
Gráfico 8 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com a categoria das vacas. 82
Gráfico 9 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com o diâmetro do FD à IATF. 83
Gráfico 10 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com o SCC. 83
Gráfico 11 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com a categoria dos animais. 84
Gráfico 12 – Distribuição do diâmetro do FD à IATF por classes. 98

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos Gordos Não-esterificados
AGV	Ácidos Gordos Voláteis
ADS	Agrupamento de Defesa Sanitária
APP	Anestro pós-parto
BEN	Balanço energético negativo
BE	Benzoato de estradiol
CAT	Catalase
CE	Cipionato de estradiol
CC	Condição corporal
CIDR	Controlled Internal Drug Release
CL	Corpo lúteo
DG	Diagnóstico de gestação
E_2	Estradiol
IGF	Factor de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 2
FIV	Fertilização *in vitro*
FD	Folículo dominante
FPO	Folículo pré-ovulatório
GH	Hormona do crescimento
GPx	Glutationa peroxidase
eCG	Gonadotrofina coriónica equina
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
ºC	Graus Celsius
H	Horas(s)
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Gonadoliberina
LH	Hormona luteinizante
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
INF-t	Interferão tau
kDa	Kilodalton
µg	Micrograma(s)
mg	Miligrama(s)
mm	Milímetro(s)
mL	Mililitro(s)
ng	Nanograma

NPY	Neuropeptídeo Y
min	Minuto(s)
O	Oeste
OGPs	*Oestrogen dependent glycoproteins*
OPU	*Ovum Pick-Up*
PTR	Palpação transrectal
PIV	Produção *in vitro*
P_4	Progesterona
PRID	Progesterone-releasing Intravaginal Device
PGE_2	Prostaglandina E_2
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina F_2 alfa
IGFBP	Proteínas transportadoras das IGFs
kg	Quilograma
GH-R	Receptor da GH
LH-R	Receptor de LH
IGFR-1	Receptor do factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFR-2	Receptor do factor de crescimento semelhante à insulina tipo 2
RMG	Reconhecimento Materno da Gestação
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SCC	*Score* de condição corporal
s	Segundo
S	Sul
SOD	Superóxido dismutase
TG	Taxa de gestação
TE	Transferência de embriões
UI	Unidades Internacionais
VE	Valerato de estradiol

INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

Em bovinicultura, um bom desempenho reprodutivo é essencial para uma gestão eficiente e produtiva, embora os objectivos específicos da reprodução possam depender, em certa medida, das condições locais e dos sistemas agrícolas individuais (Ball & Peters, 2004g). O objectivo principal de uma exploração bovina (carne ou leite) é o de obter um vitelo a cada 365 dias. No entanto, dado que a rentabilidade económica de uma exploração de carne está directamente relacionada com a venda directa de um bezerro, este objectivo torna-se ainda mais imperioso. Daí, ser fácil perceber que o desempenho reprodutivo é um factor importante que afecta a produção e a eficiência económica dos efectivos pecuários (Baruselli, n.d; O'Connor, 2007; Roelofs et al., 2010).

Existem particularidades reprodutivas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que devem ser tidas em consideração aquando do emprego de técnicas de maneio, de inseminação artificial (IA), de transferência de embriões (TE) e de aspiração folicular ecoguiada (OPU) aliada à produção *in vitro* de embriões (PIV) (Baruselli et al., 2007). Para além dessas particularidades reprodutivas, factores como o diâmetro folicular no dia da inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), bem como o *score* da condição corporal (SCC) apresentados pelas fêmeas no inico da época de reprodução são de extrema importância, uma vez que interferem directamente com a fertilidade.

Diversos estudos têm confirmado os efeitos negativos da presença de pequenos folículos durante o pró-estro e o sucesso da IATF, os quais se relacionam com um(a): secreção pré-ovulatória de estradiol insuficiente (Vasconcelos et al., 2001; Sá Filho et al., 2009); menor taxa de ovulação (Gimenes et al., 2008; Filho, Meneghetti, Peres, Lamb & Vasconcelos, 2009; Meneghetti, Filho, Peres, Lamb & Vasconcelos, 2009; Sá Filho et al., 2009); corpo lúteo de menores dimensões, com uma capacidade reduzida para a produção de progesterona (Vasconcelos et al., 2001); maior incidência de luteólise prematura (Vasconcelos et al., 2001; Peters & Pursley, 2003); modificações no ambiente uterino e do oviduto (Mann et al., 2000 citados por Peres et al., 2009); menor taxa de crescimento e menor capacidade de produção de INF-t pelos embriões em fase inicial de desenvolvimento (Mann et al., 1998 citados por Peres et al., 2009); e com um aumento das perdas gestacionais (Perry, Smith, Roberts, MacNeil & Geary, 2007).

O maneio nutricional é também ele um factor importante que controla e afecta a reprodução em vacas de carne (Short & Adams, 1988; Vizcarra, Wettemann, Spitzer & Morrison, 1998; Diskin et al., 2003). A ingestão de nutrientes de forma inadequada ou reduzida está associada à perda de peso corporal, que se manifesta em alterações no SCC, diminuição da actividade lútea, e supressão do ciclo éstrico (Vizcarra et al., 1998; Ciccioli et al., 2003).

Tendo em conta esta realidade, os objectivos gerais da presente dissertação de Mestrado Integrado foram:

1. Apresentar uma descrição sucinta das actividades desenvolvidas durante o período do estágio curricular;
2. Elaborar uma revisão bibliográfica que vá de encontro ao tema do trabalho experimental e que ofereça, ao mesmo, um suporte teórico consistente e actual, de forma a apresentar uma base científica sustentada. Nesta parte do texto serão então abordados os seguintes temas: o ciclo éstrico bovino, o diâmetro folicular e a sua influência na taxa de gestação, a condição corporal e a sua influência na taxa de gestação e o controlo farmacológico do ciclo éstrico.
3. Avaliar a relação existente entre o diâmetro folicular e a condição corporal sobre a taxa de gestação em bovinos *Bos indicus*, das raças Nelore e Tabapuã, sujeitos a um protocolo de IATF.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi desenvolvido em três áreas distintas: durante o mês de Setembro de 2014, acompanhei o meu co-orientador, Doutor João Nestor das Chagas e Silva na sua prática clínica na área de Reprodução Bovina e nas saídas de campo do Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) de SOCLA (Sintra); a segunda fase realizou-se no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (USP-FMVZ Pirassununga, Brasil), de 1 de Outubro de 2014 a 5 de Janeiro de 2015; por fim, a terceira fase do estágio realizou-se na empresa Vettotal-Serviços Veterinários Lda (São Teotónio, Portugal), estendendo-se de 23 de Fevereiro de 2015 a 29 de Abril de 2015, tendo tido a oportunidade de acompanhar o Médico Veterinário Rui Silva na sua actividade profissional, na área de Clinica de Espécies Pecuárias.

a. FMV – Lisboa

As actividades executadas durante este período (Setembro 2014), sob orientação do Doutor J. Nestor Chagas e Silva, tiveram como principal objectivo a aquisição e o aperfeiçoamento da técnica de palpação transrectal, da técnica de cateterização cervical e da técnica de IA. Para tal visitaram-se as seguintes explorações: Alto da Malhada-Moita, AgriAngus-Asseiceira, FMV-Alto da Ajuda. No total foram realizadas, pelo autor, cerca de 100 palpações transrectais, 20 cateterizações cervicais e 3 inseminações (das quais, resultou uma gestação).

As saídas com o ADS de SOCLA (Sintra) realizaram-se todas as quintas-feiras de manhã, no âmbito da Disciplina de Patologia e Clínica das Doenças Infecciosas. Pude praticar a venopunção da veia jugular (ovinos e caprinos) e da coccígea (bovinos) e, acompanhar de perto algumas provas de intradermotuberculinização em bovinos.

b. Pirassununga – São Paulo (Brasil)

O estágio no Brasil surge pelo interesse adquirido, durante o curso de Medicina Veterinária, pela área de Reprodução Animal e pelo facto de considerar o Brasil, um país extremamente interessante do ponto de vista prático, nessa mesma área.

O estágio teve a orientação do Professor Doutor Ed Hoffmann Madureira e realizou-se no campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução. Acompanhei o trabalho dos técnicos e participei nas actividades desenvolvidas na área de Reprodução Bovina (Estação de Monta 2014/15), de onde recolhi e coligi os dados com os quais elaborei a presente dissertação de mestrado.

Os trabalhos de campo realizaram-se na própria fazenda da Faculdade, com um rebanho de aproximadamente 700 bovinos das raças Nelore e Tabapuã. A coordenação e supervisão

das actividades em que me envolvi estiveram a cargo do Pós-doutorado em Medicina Veterinária, Doutor Milton Maturana Filho.

Os trabalhos realizados (Tabela 1) inseriram-se no projecto da Estação de Monta 2015, projecto este que visava compreender o efeito da suplementação mineral e vitamínica (Adaptador®, Biogénesis Bagó) associada ou não à vacinação contra doenças reprodutivas (Bioleptogen® e Bioabortogen H®, Biogénesis Bagó) sobre as taxas de gestação, em vacas de carne. Para além dos trabalhos de campo, acompanhei e participei nos trabalhos laboratoriais de processamento de amostras sanguíneas recolhidas durante o período de estágio.

Participei ainda nos trabalhos de doutoramento do Dr. Kleber Menegon Lemes, sobre indução da puberdade em novilhas (12 e 24 meses) *Bos indicus,* tendo tido ainda, a oportunidade de acompanhar a técnica de transferência embrionária, de embriões FIV, criopreservados por vitrificação.

Tabela 1 - Resumo das actividades desenvolvidas na segunda fase do estágio.

Área de intervenção	Actividades	Realizado	Observado
Reprodução Bovina	**Exame Ginecológico**		
	PTR	20	-
	Ecografia	17	2179
	Diagnóstico de Gestação		
	PTR	15	-
	Ecografia		
	Bovinos	15	478
	Ovinos	5	15
	Colocação de dispositivos intravaginais de progesterona (P_4)	997	192
	Administração injectável de hormonas	1067	-
	Outras administrações (Vacinas)	409	-
	Transferência de Embriões (FIV)	-	9
	Inseminação Artificial	1	763
	Exame Andrológico	-	1
Cirurgia	**Cesariana Caprino**	-	1
OUTROS	**Recolha de amostras de sangue**	36	1534
	Avaliação da Condição Corporal	887	-
	Tratamento Intra-uterino	1	-

c. São Teotónio (Litoral Alentejano)

Ao Brasil, seguiu-se um estágio na zona de São Teotónio, concelho de Odemira, na empresa Vettotal – Serviços Veterinários, Lda. O objectivo foi o de adquirir algum conhecimento e experiência prática na área da clínica de espécies pecuárias. Para isso, acompanhei exclusivamente o Dr. Rui Silva na sua actividade profissional, enquanto clinico de campo, participando na prática diária da clínica de espécies pecuárias (bovinos, suínos, caprinos e equídeos) (Tabela 2).

Para além desta actividade, tive oportunidade de participar nas campanhas de saneamento do ADS do Litoral Alentejano, desenvolvidas pelos Drs. Rui Silva e Nuno Raposo.

Tabela 2 - Resumo das actividades desenvolvidas na terceira fase do estágio.

Área de intervenção	Actividades	Realizado	Observado
Obstetrícia	**Partos**		
	BOVINOS		
	Eutócico	-	21
	Distócico	-	10
	Episiotomia	-	6
	OVINOS		
	Eutócico	1	-
	Distócico	-	1
	Cesariana	-	7
	Prolapso Uterino	-	6
	Prolapso Vaginal	-	2
Cirurgia	**Descorna**	-	1
	Amputação Uterina	-	1
	Enterectomia Jejunal	-	1
	Uretrostomia em Vitelo	-	1
		Nº de casos	
Reprodução	**Exame Andrológico**	2	
	Inseminação Artificial Tempo Fixo (IATF)	4	
	Exame Ecográfico		
Clinica (Diagnóstico e Tratamento)	**BOVINOS ADULTOS**		
	Indigestão Vagal	4	
	Timpanismo Gasoso/Espumoso	1/1	
	Acidose Ruminal	1	
	Invaginação Intestinal	1	
	Dilatação Cecal	1	
	Peritonite	2	
	Pericardite	1	
	Pneumonia	4	

Leptospirose	1
Síndrome de Vaca Caída	3
Hipomagnesiémia	1
Metrite	2
Mamite	3
Papilomatose	1
Actinobacilose	2
Infecção Urinária	2
Abcessos	1
Tiloma	1
Corte correctivo de casco	1
Transfusão sanguínea	1
VITELOS	
Diarreias Neonatais	20
Coccidiose	5
Clostridiose Vitelo	1
Pneumoenterite	8
Pneumonia	5
Onfalite+Poliartrite	7
Otite	1
Hérnia Umbilical	1
Traqueíte	1
Fractura Metacarpo	1
Cegueira Intracraniana	1
OVINOS	
Ringwomb	1
SUÍNOS	
Otite	1
EQUINOS	
Abcesso	1
Sutura Laceração Cutânea	1
Identificação	4

I. GENERALIDADES SOBRE O CICLO ÉSTRICO BOVINO

1.1. O CICLO ÉSTRICO BOVINO

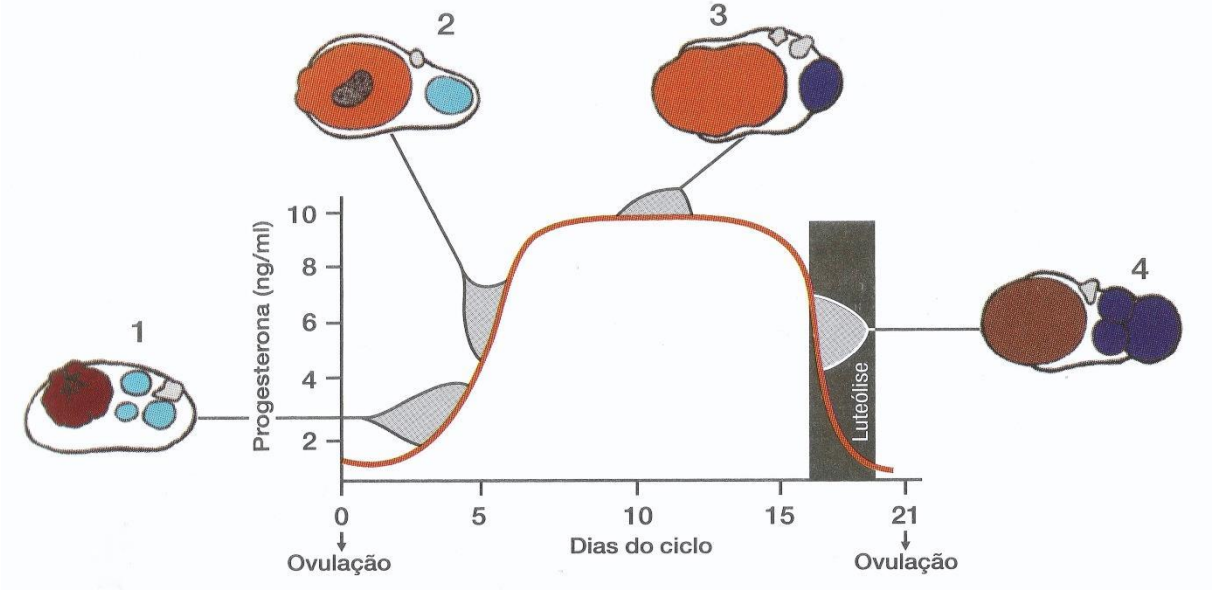
Após a puberdade, as fêmeas bovinas entram num período de ciclicidade reprodutiva que continua durante a maior parte da sua vida produtiva, a menos que estas se encontrem em período gestacional final ou de anestro (Diskin, Mackey, Roche & Sreenan, 2003 citados por Sartori & Barros, 2011). A puberdade, definida como o processo através do qual os animais tornam-se capazes de se reproduzir, representa um marco fisiológico crítico na vida reprodutiva de novilhas (Estill, 2015). Nesse momento, ocorre o primeiro estro, o qual se deve associar a uma ovulação potencialmente fértil e a uma fase lútea de duração normal (Stevenson, 2007). Segundo Estill (2015), essa fase é atingida no dia em que as concentrações sanguíneas de progesterona (P_4) revelam um valor superior a 1 ng/mL.

Para além do peso vivo (40-50% do peso vivo em adulto), principal factor que afecta a idade à puberdade em bovinos (Stevenson, 2007), àquela com que as novilhas atingem a puberdade, pode ser influenciada por: genótipo (p. ex. *Bos taurus* vs*. Bos indicus*), raça, plano nutricional, fotoperíodo, época de nascimento ou presença de macho (Ball & Peters, 2004h; Stevenson, 2007; Estill, 2015). Embora o primeiro cio seja considerado como o principal marco do início da puberdade, normalmente as novilhas só atingem a fertilidade plena ao seu terceiro cio (Sartori et al., 2010).

O ciclo éstrico, definido como o período de tempo compreendido entre dois estros consecutivos (Binelli, Ibiapina & Bisinotto, 2006), é caracterizado pelo crescimento e pela regressão de folículos e corpo lúteo (CL). Tem uma duração aproximada de 21 dias (Ball & Peters, 2004; Binelli et al., 2006; Stevenson, 2007; Forde et al., 2011; Sartori & Barros, 2011; Amstalden & Williams, 2015), podendo no entanto variar entre os 18-24 dias (Forde et al., 2011) (Figura 1). Em novilhas, de uma forma geral, a duração do ciclo éstrico é mais curta em cerca de 1-2 dias (Stevenson, 2007).

Na vaca, animal poliéstrico anual, a actividade cíclica tem então uma distribuição uniforme no tempo, excepto durante a gestação e em certas situações que podem conduzir a um estado de anestro (sub-nutrição, pós-parto, amamentação, stress térmico e infecções uterinas).

Figura 1 - O Ciclo éstrico bovino. Morfologia do Corpo Lúteo e o perfil da Progesterona plasmática. Retirado de Ribeiro (2015).

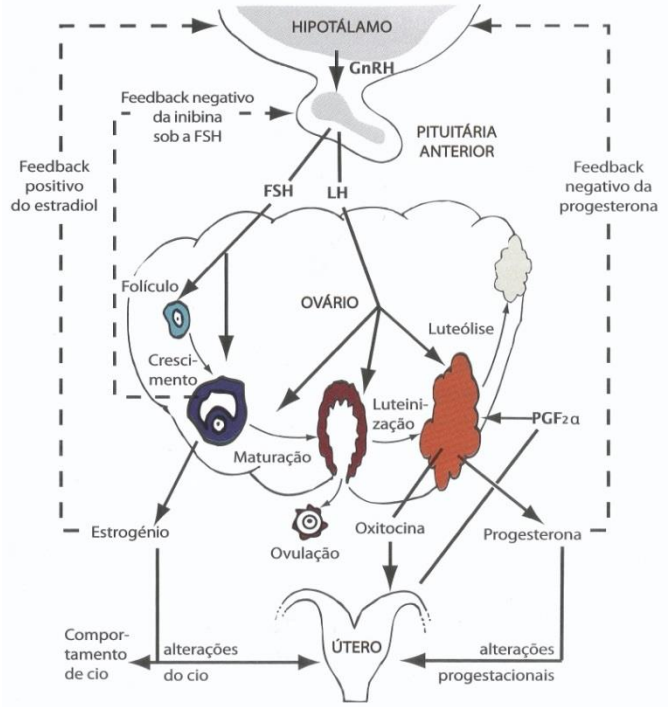


Legenda: 1. Corpo Hemorrágico proveniente da ovulação (dias 1-5); **2.** CL em desenvolvimento com 5 a 7 dias. **3.** CL maduro no auge da secreção de progesterona (dias 7-14). **4.** CL em regressão, com rápida queda dos níveis de progesterona (dias 17-21) e folículo pré-ovulatório na fase final da maturação.

1.1.1. Regulação neuro-endócrina do ciclo éstrico bovino

O controlo neuro-endócrino do ciclo éstrico envolve a integração de múltiplos sinais reguladores, os quais permitem controlar determinadas funções ováricas (crescimento folicular, ovulação, luteinização e luteólise) (Figura 2).

Figura 2 - Controlo neuro-endócrino do ciclo éstrico bovino. Retirado de Ribeiro (2015).



A secreção da hormona gonadoliberina (GnRH), um polipeptídeo com 10 aminoácidos (Ball & Peters, 2004a), dentro da circulação hipotálamo-hipofisária é considerada o primeiro mecanismo endócrino regulador da síntese e libertação de gonadotrofinas (Amstalden & Williams, 2015). Este processo, na fêmea, é controlado por duas áreas distintas do hipotálamo, ambas constituídas por aglomerados de corpos de células nervosas. O centro tónico de GnRH, responsável pela secreção basal de GnRH e o centro hipotalâmico, conhecido como centro de pulsos (também chamado de centro pré-ovulatório), que é responsável pela libertação pré-ovulatória de GnRH que induz um aumento de LH, necessário à ovulação. Em condições naturais, o pulso pré-ovulatório de GnRH ocorre apenas uma vez durante o ciclo éstrico, enquanto a sua libertação tónica tem lugar durante todo o ciclo éstrico (Senger, 2003b citado por Raposo, 2013).

Para além desta hormona produzida no hipotálamo, outras hormonas desempenham um papel fundamental no controlo do ciclo éstrico, funcionando através de um sistema de retroalimentação positiva e negativa (Roche, 1996 citado por Forde et al., 2011). São elas, a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH), ambas produzidas na hipófise anterior (adeno-hipófise), a progesterona (P_4), o estradiol (E_2) e a inibina, produzidas nos ovários e a $PGF_{2\alpha}$, produzida no útero.

Depois do transporte da GnRH do hipotálamo para a hipófise, via sistema porta-hipofisário (Moenter et al., 1992 citados por Forde et al., 2011), ela liga-se ao seu receptor acoplado à proteína G na superfície das células gonadotróficas e promove a libertação do cálcio intracelular (Kakar et al., 1993 citados por Forde et al., 2011). Dessa forma são activadas certas substâncias intermediárias, culminando na libertação de FSH e LH, a partir de zonas de armazenamento, no citoplasma (Forde et al., 2011). Estas duas gonadotrofinas alcançam as gónadas através da circulação sanguínea e actuam no ovário para estimular o crescimento e maturação foliculares, a ovulação do folículo pré-ovulatório (FPO), e a síntese de hormonas esteróides e peptídicas. As hormonas sexuais, por sua vez, exercem acções de retroacção (*feedback*) a nível central e da adeno-hipófise, para controlar a libertação de GnRH e das gonadotrofinas (Amstalden & Williams, 2015).

Durante a fase folicular do ciclo éstrico, as concentrações de P_4 começam a diminuir devido à regressão do CL que então se inicia e as concentrações de E_2 são cada vez maiores, devido ao rápido crescimento do folículo dominante (FD) pré-ovulatório. Segundo Stevenson (2007), citado por Raposo (2013), embora o crescimento folicular possa ser estimulado isoladamente, pela FSH, uma combinação de FSH e LH induz uma síntese máxima de E_2 *in vitro*. Assim, ambas as gonadotrofinas influenciam o desenvolvimento folicular e por via disso, a secreção de E_2.

Segundo Rahe et al. (1980), citados por Amstalden e Williams (2015), o aumento das concentrações de E_2 atingem um limiar máximo, cerca de 12-18 horas antes do início do estro, desencadeando um pico pré-ovulatório de libertação de GnRH e, consequentemente,

um aumento na libertação das gonadotrofinas (FSH e LH). O pico pré-ovulatório de LH consiste no somatório de pulsos muito rápidos de secreção de LH (cerca de 1 por hora ou mais), os quais (1) segundo Espey (1980), citado por Ball e Peters (2004h) estimulam o processo de ovulação através da activação da reacção inflamatória responsável pela ruptura da parede do folículo e (2) iniciam a luteinização das células da teca e da granulosa do folículo, para dar origem ao CL. Para além destas funções, a LH é igualmente responsável pelo processo de maturação folicular que ocorre durante cada onda de crescimento folicular. Apenas quando a concentração sérica de P_4 é basal e os pulsos de LH ocorrem de forma apropriada (alta frequência, baixa amplitude) é que se dá a ovulação.

Após a ovulação, a concentração de P_4 no sangue começa a aumentar gradualmente até que atinge o pico, 8 dias depois. Nesta fase, em que as concentrações sanguíneas de P_4 dominam (fase lútea), as concentrações de LH tornam-se cada vez mais baixas, verificando-se pulsos de alta amplitude e baixa frequência (aproximadamente 1, a cada 4 horas) (Ball & Peters, 2004e). Ao contrário do que sucede com a LH, as concentrações de FSH e E_2 sofrem flutuações em associação com o desenvolvimento das ondas de crescimento e de atrésia foliculares. Ao dia 17 do ciclo éstrico, aproximadamente, e na ausência de gestação ou de um embrião viável, pulsos marcados de $PGF_{2\alpha}$ são produzidos pelo endométrio, causando a regressão do CL.

A P_4 sintetizada pelo CL durante a fase lútea do ciclo éstrico desempenha um papel fundamental, promovendo a competência do oócito e o estabelecimento de receptividade uterina (Fair & Lonergan, 2012, citados por Martins et al., 2014). O seu efeito, ao nível do controlo da libertação episódica de GnRH e LH encontra-se bem caracterizado. Actuando ao nível do hipotálamo, a P_4 é capaz de inibir a libertação de GnRH e assim diminuir a frequência de libertação de LH (Amstalden & Williams, 2015). Num trabalho desenvolvido por Goodman, Gibson, Skinner & Lehman (2002) em ovelhas e citado por Amstalden & Williams (2015), o mecanismo pelo qual a P_4 inibe a libertação de LH parece ser mediado por peptídeos opióides endógenos, particularmente a dinorfina.

As acções de *feedback* positivo e negativo do E_2 e da P_4 ao nível do hipotálamo e da adeno-hipófise explicam a maior parte das alterações nos padrões de libertação de GnRH e LH durante o ciclo éstrico (Amstalden & Williams, 2015). O E_2, produzido durante a fase folicular pelo FD em crescimento, tem uma acção de *feedback* positivo sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise. Trata-se do mecanismo fisiológico principal que conduz ao desenvolvimento do pico pré-ovulatório de GnRH e LH, durante a fase folicular tardia. As acções de *feedback* negativo sobre a libertação de LH são, no entanto, mais complexas. Durante os períodos em que a concentração de P_4 é elevada (p. ex. fase lútea), o E_2 promove a inibição dos pulsos de libertação de LH pela via da P_4. De acordo com dois trabalhos realizados em ovinos, Goubillon et al. (2000) e Foradori et al. (2002) e citados por Amstalden & Williams (2015), esse efeito pode envolver acções directas do E_2 sobre neurónios endógenos de péptidos

opióides, incluindo os neurónios dinorfina no núcleo arqueado que, nas ovelhas, são conhecidos por expressar α receptores de estrogénio e receptores de P_4. Pelo facto de o E_2 aumentar a expressão dos receptores de P_4 no núcleo arqueado em ovelhas ovariectomizadas (Scott et al., 2000 citados por Amstalden & Williams, 2015), é possível concluir que ele potencializa o efeito de *feedback* negativo da P_4 no hipotálamo, por implicar maior capacidade de resposta dos neurónios para as acções dependentes de P_4.

As flutuações nas concentrações de péptidos ováricos (inibina, folistatina) e de E_2, que ocorrem durante o ciclo éstrico, desempenham papéis importantes na regulação do padrão de secreção de FSH (Amstalden & Williams, 2015). O E_2 está envolvido no controlo a curto prazo da flutuação plasmática daquela hormona, enquanto a inibina regula os seus níveis, a longo prazo (Gordon, 1996a, citado por Raposo, 2013). Segundo Cupp et al. (1995), citados por Amstalden & Williams (2015), a acção directa do E_2 parece ocorrer através da inibição da expressão do gene FSH-C. No entanto, num trabalho desenvolvido por Martin, Price, Thiéry & Webb (1988), citados por Amstalden & Williams (2015), a combinação de E_2 e inibina parece necessária para uma inibição total do pico das concentrações de FSH, pós-ovariectomia.

A inibina, um dímero com duas subunidades (α e β) é produzida pelas células foliculares e actua como factor endócrino na regulação da libertação de FSH. Ela suprime a libertação de FSH pela adeno-hipófise. Segundo Kaneko et al. (1993), citados por Amstalden & Williams (2015), o efeito da inibina na regulação da libertação de gonadotrofinas parece ser exercido especificamente através do controlo da libertação de FSH, porque não há nenhum efeito claro da inibina sobre a libertação de LH. Outras hormonas ováricas parecem também desempenhar um papel importante na regulação do ciclo éstrico, através da sua acção ao nível da libertação da FSH. A activina e a folistatina são hormonas produzidas por células foliculares e regulam a secreção de FSH. A activina, para além de estimular a síntese e a libertação de FSH, aumenta a produção de E_2 no fluido folicular (Knight & Glister, 2003, citados por Forde et al., 2011), enquanto a folistatina inibe as acções da activina, ao se ligar ao receptor da activina (Amstalden & Williams, 2015).

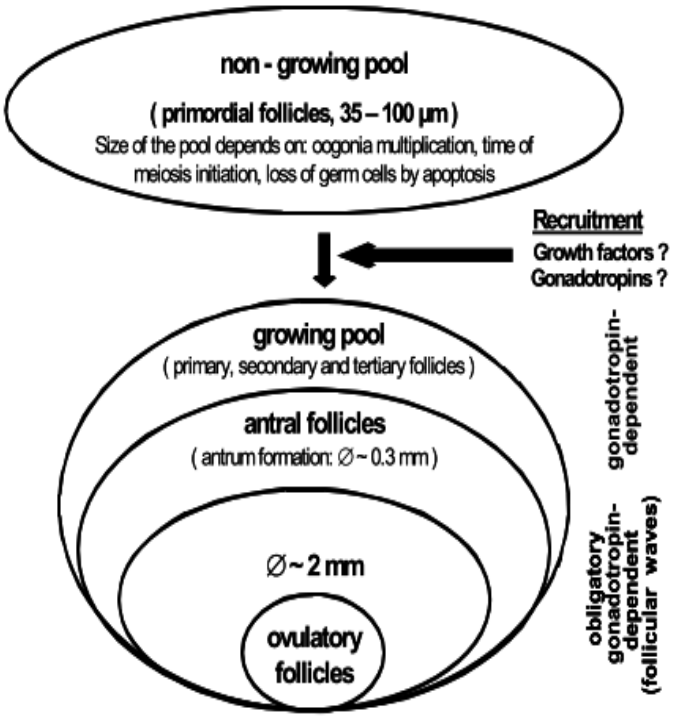
Outros factores intra-ováricos também desempenham, indirectamente, um papel importante na regulação do ciclo éstrico, ao alterarem a síntese de E_2, ou directamente, por mecanismos de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise. Exemplo disso é o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF). Esta superfamília, que consiste em dois ligandos (IGF-1 e IGF-2), dois receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e inúmeras proteínas e proteases de ligação, é responsável pela biodisponibilidade do IGF-1 no folículo ovárico (Forde et al., 2011). Esta biodisponibilidade do IGF-1 contribui para o crescimento, proliferação e capacidade esteroidogénica do futuro FD, afectando indirectamente o mecanismo de *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise induzido pelo E_2. Este facto, para além da aquisição antecipada de receptores LH (LH-R) pelas células da

granulosa dos folículos submetidos à selecção, é considerado o principal mecanismo que contribui para o processo de selecção folicular (Forde et al., 2011).

1.1.2. Dinâmica folicular

O ovário dos bovinos contém duas diferentes populações de folículos: a dos folículos em não-crescimento (*non-growing pool*) e a dos folículos em crescimento (*growing pool*) (Kanitz, 2003) (Figura 3). Segundo Kanitz et al. (2001), citados por Kanitz (2003), a coorte de folículos em não-crescimento é composta exclusivamente por um grupo de folículos primordiais, os quais após um período de transição, transformam-se em folículos primários, passando assim a pertencer à coorte de folículos em crescimento. Neste processo, os oócitos aumentam em tamanho e as células da granulosa circundantes proliferam e tornam-se cubóides (Fortune et al. 2000, citados por Kanitz, 2003). Estudos *in vitro,* realizados em tecido ovárico de ratos, demonstraram que o factor inibidor de leucemia (LIF) e o factor de crescimento dos fibroblastos (bFGF) foram capazes de promover a transição de folículos primordiais para folículos primários (Nilsson et al*.,* 2001, 2002, citados por Kanitz, 2003). Para além dos folículos primários, a *pool* dos folículos em crescimento é composta por folículos secundários e terciários.

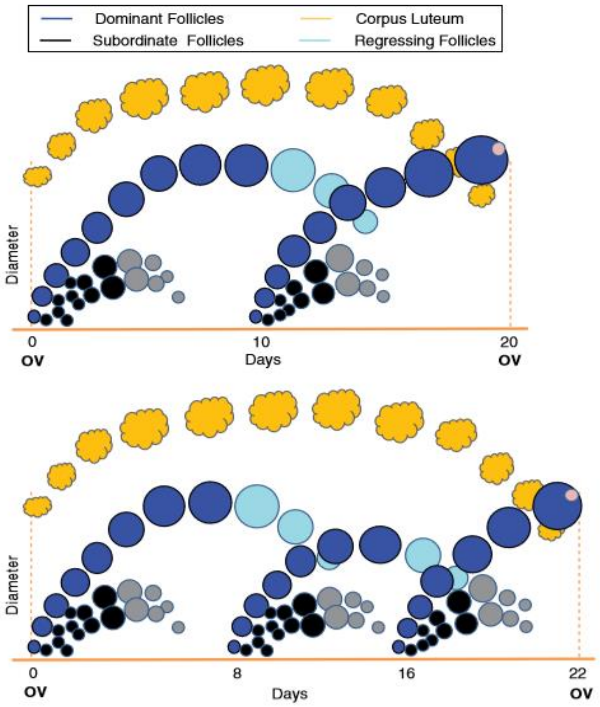
Figura 3 - Diagrama esquemático da população folicular em bovinos. Retirado de Kanitz (2003).



Durante o ciclo éstrico bovino, o desenvolvimento e a regressão foliculares ocorrem segundo um padrão de ondas (Baruselli, Gimenes & Sales, 2007; Stevenson, 2007; Sartori & Barros, 2011), sendo apenas a última onda a ovulatória (Binelli et al., 2006). A maioria dos bovinos (> 95%) apresenta ciclos éstricos compostos por 2 ou 3 ondas de desenvolvimento folicular (Adams & Singh, 2015) (Figura 4), estando igualmente descritos, ciclos éstricos de 4 ondas. Nos zebuínos, existem relatos que descrevem uma maior incidência do padrão de 3 ondas, tendo sido notificada também a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo éstrico (Baruselli et al., 2007). Adams & Singh (2015) relataram também o aumento da proporção do padrão de 3 ondas em associação com baixos planos nutricionais e em situações de stress térmico. De acordo com estes últimos autores, ciclos de duas ondas foliculares são 3 dias mais curtos que os de três ondas foliculares (19,8 ± 0,2 vs. 22,5 ± 0,3; P <0,01). Segundo eles, a maioria dos ciclos de duração inferior ou igual a 21 dias, era do padrão de duas ondas (88%; p <0,05), enquanto a maioria dos ciclos de 22 ou mais dias era do padrão de três ondas (78%; p <0,05).

Os dois ovários agem como uma única unidade, ou seja, respondem em uníssono aos factores que regulam a dinâmica das ondas foliculares, sendo que um ovário não tem ondas foliculares independentes do outro. Assim sendo, uma onda folicular é o resultado do crescimento de múltiplos folículos em ambos os ovários (Adams & Singh, 2015).

Figura 4 - Ciclo éstrico bovino com duas (superior) ou três ondas (inferior) de desenvolvimento folicular. Retirado de Adams & Singh (2015).

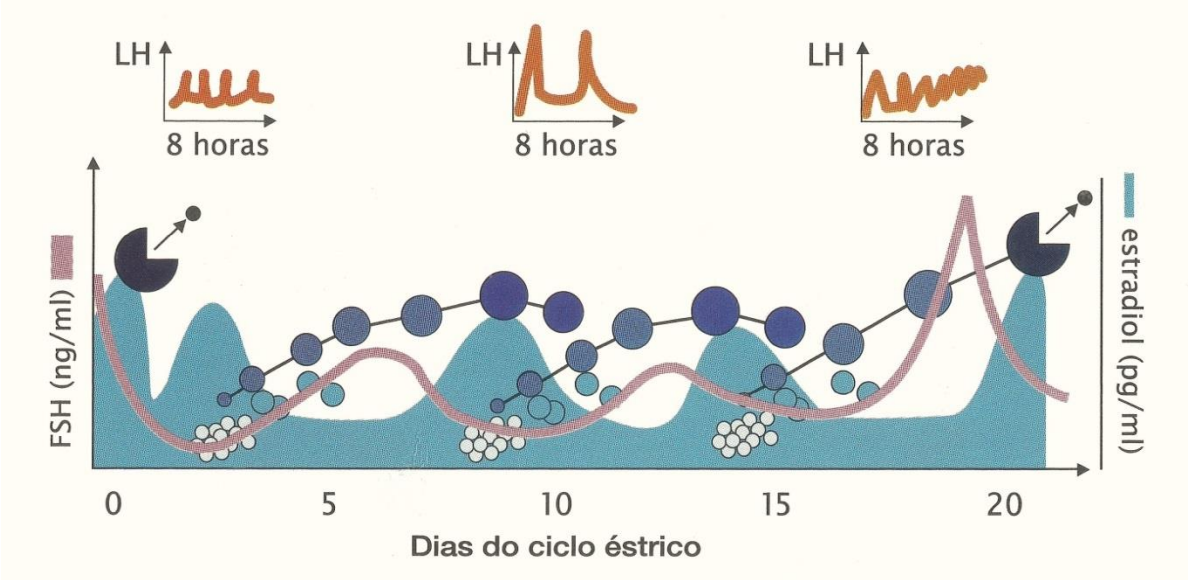


Cada onda de crescimento folicular envolve uma fase de emergência, selecção e dominância, as quais se seguem a atrésia ou ovulação do FD (Forde et al., 2011). Durante a onda folicular, um grupo de pequenos folículos é recrutado (emergência folicular), iniciando

uma fase de crescimento comum durante cerca de 3 dias. Destes, apenas um continua o seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados), estabelecendo-se assim o fenómeno de divergência folicular. Uma vez dominante, o FD passa por três fases distintas de desenvolvimento: fase de crescimento (diâmetro crescente); fase estática (poucas mudanças no seu diâmetro); e fase de regressão (diâmetro decrescente - atrésia).

Após a divergência, e na presença de elevados níveis de P_4 - que promovem a redução na frequência pulsátil de LH - o FD torna-se anovulatório. A partir desse momento tem início o processo de atrésia e perda de dominância, dando origem a uma nova onda de crescimento folicular (Ginther et al., 1989; Webb et al., 1999, citados por Baruselli et al., 2007). Numa situação contrária, o FD presente no momento da regressão lútea ovula, pois deixa de existir o efeito inibitório da P_4 sobre a LH. Nesse momento, e se não houver fertilização do oócito ovulado, o ciclo repete-se (Figura 5). O início de uma onda de crescimento folicular depende assim do término da onda que a precedeu, sendo cada fase de crescimento controlada por mecanismos específicos (Binelli et al., 2006).

Figura 5 - Ciclo éstrico bovino de três ondas foliculares e respectiva variação hormonal. Retirado de Ribeiro (2015).



A emergência de uma onda de crescimento folicular e a selecção do FD estão temporalmente e causalmente associadas a uma ascensão e queda nas concentrações de FSH (Adams & Singh, 2015). Com a atrésia ou ovulação do FD do ciclo anterior, diminuem as concentrações plasmáticas de inibina e de E_2. Como estas hormonas inibem a produção de FSH, a sua diminuição resulta num pico de FSH com origem na hipófise anterior e daí, no recrutamento de uma nova onda (Adams et al., 1992b, citados por Binelli et al., 2006). A emergência da primeira onda folicular ocorre de forma consistente no dia da ovulação, quer estejamos na presença dum padrão de crescimento folicular de 2 ou 3 ondas. O surgimento da segunda onda folicular ocorre por volta do dia 9 ou 10, para ciclos de duas ondas, e por

volta do dia 8 ou 9, em ciclos de três ondas. Em ciclos de três ondas, uma terceira onda emerge no dia 15 ou 16 (Colazo & Mapletoft, 2014; Adams & Singh, 2015).

A emergência ou recrutamento da onda folicular é sempre precedida por uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH (Adams et al. 1992; Sunderland et al. 1994, citados por Adams & Singh, 2015), e consiste no crescimento síncrono de um grupo de folículos (5-20 folículos ≥ 5mm) em resposta àquela hormona (Forde et al., 2011). Isto marca o começo de uma fase em que o crescimento folicular é FSH dependente (Ginther et al., 2002, citados por Forde et al., 2011) com os receptores de FSH (FSH-R) localizados nas células da granulosa dos folículos, por volta do dia 3 da onda folicular (Camp et al., 1991; Evans & Fortune, 1997, citados por Forde et al., 2011). À medida que os folículos crescem, a sua capacidade de produção de E_2 e inibina aumenta, diminuindo paulatinamente a libertação de FSH (Gibbons et al., 1997, citados por Binelli et al., 2006).

O E_2 e a inibina A e B são os principais produtos foliculares responsáveis pela inibição da libertação de FSH. A inibina A é produzida por todos os pequenos folículos em crescimento e parece ser o mais importante supressor de FSH durante os primeiros 2 dias de surgimento da onda; o E_2, segregado a partir do FD é considerado o supressor mais importante de FSH, posteriormente (Adams & Singh, 2015). Desta forma, as concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atrésia. Apenas um é seleccionado, por conseguir continuar a crescer sob a influência de concentrações limitantes de FSH (Binelli et al., 2006).

Em espécies monovulatórias, o termo "selecção" refere-se ao processo pelo qual um único folículo torna-se, funcional e morfologicamente dominante sobre outros folículos (Adams & Singh, 2015), sendo este processo traduzido pela capacidade de um folículo inibir o crescimento dos demais (Binelli et al. 2006). Ultrassonograficamente pode definir-se a selecção pelo momento do desvio folicular, que é aquele em que o folículo seleccionado passa a ter uma taxa de crescimento superior à dos outros folículos recrutados na mesma onda (Ginther et al., 2001, citados por Binelli et al., 2006).

Na espécie bovina, o mecanismo de selecção do FD encontra-se na dependência relativa dos folículos à FSH e, na sua capacidade de resposta em relação à LH. O aumento transitório da concentração de FSH permite o crescimento folicular suficiente para que alguns (não todos) folículos adquiram capacidade de resposta à LH, podendo este facto ser explicado pela aquisição de LH-R, por parte das células da teca e da granulosa (Forde et al., 2011). Desta forma, o folículo adquire capacidade para sobreviver num ambiente pobre em FSH, continuando a crescer, aumentando assim a sua aptidão para produzir E_2 e inibina, tornando-se dominante. À medida que o FD se desenvolve, a elevação pré-ovulatória da LH afecta o oócito, estimulando o reinício da meiose, que tinha sido suspensa no início da vida fetal na fase diplóteno da primeira divisão meiótica (maturação).

A produção de elevadas concentrações de E_2 pelo FD é a característica que melhor o define, pois apresenta maiores concentrações dessa hormona no fluido folicular, em comparação com os outros (Fortune, 1994; Sunderland et al., 1994; Mihm et al., 2000, citados por Forde et al., 2011). Para além disso, a manutenção de baixas concentrações intra-foliculares das proteínas de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina -2, -4 e -5 (IGFBPs) e da folistatina, bem como o aumento das concentrações intra-foliculares de IGF-1 e o maior tamanho do folículo, permitem distinguir o FD dos folículos subordinados (Diskin, Austin & Roche, 2002).

A co-dominância em bovinos, definida como a presença de mais do que um FD numa onda, apresenta uma incidência baixa. No entanto, cerca de 21 a 36% dessas situações têm sido relatadas em vacas leiteiras (Sartori et al., 2004, citados por Adams & Singh, 2015), principalmente nas de alta produção. A co-dominância associa-se a um perfil de menor diâmetro folicular, sugerindo por isso competição dos folículos pela disponibilidade limitada de LH. Segundo o trabalho de Lopez et al*.* (2005), citados por Adams e Singh (2015), constatou-se que nas vacas que ovularam mais do que um folículo, todos eles surgiram a partir da mesma onda folicular e, que o processo de desvio esteve associado a menores concentrações circulantes de inibina e P_4, em comparação com vacas que desenvolveram um único FD.

Durante maior parte do período gestacional é possível observar um desenvolvimento folicular através de um padrão de ondas. Segundo trabalhos realizados por Ginther et al. (1989), Bergfelt et al*.* (1991) e Ginther et al*.* (1996), citados por Adams & Singh (2015), este fenómeno ocorre durante a maior parte da gestação, com excepção dos últimos 21 dias, em que não foram detectados folículos de diâmetro ≥ 6 mm. Na presença da P_4, as ondas foliculares anovulatórias emergem em intervalos regulares. No entanto, com o avançar da gestação, o diâmetro máximo do FD tende a ser menor, assim como o intervalo entre ondas (Adams & Singh, 2015).

1.1.3. A ovulação

A ovulação envolve uma série de eventos que culminam com a evacuação do conteúdo ântrico do folículo, incluindo o seu complexo *cumulus-oócito* e, o início do desenvolvimento de um CL (Adams & Singh, 2015). Tem por base a activação de uma cascata bioquímica por acção da LH (Kanitz, 2003), em que se verifica uma extensa remodelação da matriz do ovário (alterações vasculares, desintegração da membrana basal, ruptura da parede do folículo) (Adams & Singh, 2015). Segundo Kanitz (2003), a regulação local da ovulação envolve a interacção entre a LH e determinados factores intra-foliculares incluindo esteróides, prostaglandinas, péptidos derivados de células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e células esteroidogénicas. Este autor afirma que o aumento da actividade do

factor de activação do plasminogénio e da plasmina pode ser o elemento que contribui para os mecanismos de ruptura folicular, nos bovinos.

A ruptura do folículo antral maduro (em regra geral, apenas um folículo) faz dispersar o seu conteúdo para a cavidade abdominal, libertando o oócito não fertilizado, ainda cercado pelas células do *cumulus*. Aquele é recolhido pelas fímbrias do oviduto e transportado ao longo deste através de uma combinação entre a acção ciliar e as contracções musculares das suas paredes (Ball & Peters, 2004e).

A ovulação, que ocorre no dia 1 do ciclo éstrico (10-14 horas após o estro, 24-32 horas após o pico de LH), é induzida por um aumento na secreção de LH resultante de alterações endócrinas desencadeadas pela luteólise. Uma diminuição nas concentrações circulantes de P_4 pós-luteólise remove o efeito do *feedback* negativo desta hormona sobre a adeno-hipófise e o hipotálamo, resultando num aumento da frequência dos pulsos de LH (cerca de 1 por hora ou mais). Segundo Hunter (2003), citado por Roelofs, López-Gatius, Hunter, van Eerdenburg & Hanzen (2010), o tempo de ovulação é dependente da maturação do FD, uma vez que é a quantidade de E_2 por ele sintetizado, que através da sua acção de *feedback* positivo sobre a libertação de GnRH, regula o seu próprio tempo de ovulação.

Nos bovinos, a capacidade ovulatória pode ser definida como o diâmetro mínimo em que um FD é capaz de ovular em resposta a um tratamento com um indutor da ovulação (Gimenes et al., 2008). Neste ensaio, a capacidade ovulatória foi adquirida por folículos com dimensões entre os 7,0 e os 8,4 mm em novilhas *Bos indicus* (média de 7,6 mm), o que parece ser um pouco inferior ao que se verifica em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus).*

1.1.4. Formação do CL e o processo de luteólise

O crescimento e a regressão do CL durante o ciclo éstrico representam um dos processos dinâmicos mais rápidos existentes no corpo (Adams & Singh, 2015).

O CL consiste num folículo diferenciado em que as células da teca e da granulosa dão origem a células lúteas esteroidogénicas pequenas e grandes, respectivamente (Gordon, 2005a). Sob a acção da LH (principal hormona luteotrópica nos bovinos), as células da granulosa e da teca expandem o seu volume através de um processo de vascularização e luteinização para formar o CL funcional (Adams & Singh, 2015). Ambos os tipos de células que formam o CL têm a capacidade para produzir P_4 (Stevenson, 2007). No entanto, as células lúteas pequenas possuem quase todos os receptores de LH e têm *in vitro*, seis vezes mais capacidade de resposta à LH, relativamente à produção de P_4, que as células lúteas grandes. Contudo, as células lúteas pequenas representam cerca de 20% da população de células lúteas totais e contribuem aproximadamente com 15% da P_4 produzida pelo CL, enquanto o restante é da responsabilidade das células lúteas grandes. Estas, embora não tenham receptores de LH, têm uma grande quantidade de receptores para a $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2 e, para além de produzirem P_4, têm também a capacidade de produzir

neurofisina e oxitocina, semelhante à produzida pelo hipotálamo e armazenada na hipófise posterior (Stevenson, 2007).

A função principal do CL é a de produzir concentrações de P_4 suficientes durante toda a fase lútea do ciclo éstrico, de forma a preparar o útero para a recepção de um embrião viável (Ball & Peters, 2004e; Forde et al., 2011). Segundo Adams e Singh (2015), a concentração plasmática de P_4 está altamente correlacionada com o peso, volume e histomorfologia do CL, bem como, com a sua morfologia à ecografia. Durante a fase de diestro, elevadas concentrações de P_4 em circulação regulam negativamente o receptor de P_4 nuclear no endométrio (Kimmins & MacLaren, 2001, citados por Forde et al., 2011).

Se, pelo dia 16-17 do ciclo éstrico, o sinal de reconhecimento materno da gestação (interferão-tau) não é detectado em quantidades suficientes, o CL começa a regredir sob a influência de pulsos de $PGF_{2\alpha}$ com origem endometrial (Ball & Peters, 2004h; Stevenson, 2007; Forde et al., 2011), sendo a $PGF_{2\alpha}$ transferida até ao ovário adjacente por um mecanismo de contra-corrente entre a veia uterina e a artéria ovárica (Ball & Peters, 2004h; Stevenson, 2007; Forde et al., 2011). O E_2 produzido pelo FD no final do ciclo éstrico é responsável pelo início deste processo de luteólise, através da indução da produção de $PGF_{2\alpha}$. Ele estimula a produção de receptores de oxitocina no endométrio que, quando ocupados pela oxitocina, activam a enzima fosfolipase A2, produzindo-se ácido araquidónico a partir de fosfolípidos membranários. Através da cascata do ácido araquidónico, é então aí, produzida a $PGF_{2\alpha}$ (Stevenson, 2007).

O mecanismo pelo qual a $PGF_{2\alpha}$ provoca luteólise não está totalmente definido, mas o mais provável é que ela iniba a activação do sistema adenil ciclase no CL (por acção da LH), impedindo a produção de P_4 pelas células grandes e pequenas (Ball & Peters, 2004e).

1.2. Diferenças de Fisiologia Reprodutiva entre *Bos indicus* e *Bos taurus*

Ao longo de vários anos, o gado bovino foi sendo seleccionado especialmente para a produção de carne ou leite, sendo a maioria das raças pertencentes às subespécies *Bos taurus* ou *Bos indicus* (Zebu) (Sartori et al., 2010). Devido a uma selecção intensiva, as raças *Bos taurus* tornaram-se extremamente eficientes para a produção de alimentos, em comparação com as demais, da outra subespécie. No entanto, o seu poder de adaptação a determinadas regiões do globo foi-se perdendo.

Animais *Bos taurus* melhorados não se encontram bem adaptados a ambientes tropicais, não conseguindo, por esse facto, maximizar o seu potencial produtivo, nessas latitudes. O principal problema que esses bovinos aí encontram é o stress térmico, ao qual apresentam muito baixa tolerância (Sartori et al., 2010). Para além disso, encontram-se menos adaptados relativamente aos animais *Bos indicus* face a outros factores de stress como: humidade, ectoparasitas e pastagens de baixa qualidade (Bó et al., 2003). Esta necessidade

de tolerância ambiental significa que o gado Zebu pode prosperar onde o gado *Bos taurus* não o consegue (Sartori et al., 2010).

Apesar das raças *Bos taurus* serem mais precoces, o gado Zebu é amplamente utilizado nos trópicos, especialmente no Brasil, devido à sua excelente capacidade de adaptação nestas zonas. Neste país, existem cerca de 200 milhões de bovinos, dos quais 80% são zebuínos ou cruzados zebuínos (Sartori et al., 2010; Sartori & Barros, 2011).

Para além destes aspectos, existem particularidades reprodutivas distintas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que devem ser tidas em consideração aquando do emprego de determinadas técnicas de maneio e de reprodução (Baruselli et al., 2007). Particularidades reprodutivas ao nível da puberdade, dos padrões do ciclo éstrico, do comportamento de cio, da aquisição de capacidade ovulatória por parte do folículo, das estruturas ováricas e da concentração das hormonas reprodutivas encontram-se já relatadas (Sartori et al., 2010).

1.2.1. Puberdade

Há diferenças claras na idade em que os bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* atingem a puberdade. Geralmente, as novilhas zebuínas atingem a puberdade e a maturidade sexual mais tardiamente que as novilhas *Bos taurus* (Sartori et al., 2010). Nestas últimas, a puberdade poderá ter início por volta dos 6-12 meses de idade, com um peso vivo aproximado de 200-250 Kg (Forde et al., 2011). Em novilhas *Bos indicus*, a puberdade geralmente ocorre mais tarde e durante um intervalo de tempo mais alargado (15-27 meses de idade) (Amstalden & Williams, 2015).

Independentemente do desenvolvimento corporal e do nível de nutrição, o gado zebu é menos precoce que o gado taurino, em relação à puberdade, porque a pressão de selecção para a puberdade tem sido muito menos intensa nos animais *Bos indicus*, em relação aos animais *Bos taurus* (Sartori et al., 2010).

1.2.2. Ciclo éstrico e dinâmica folicular

Existem diferenças na dinâmica folicular entre as duas subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma dessas diferenças diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular durante cada ciclo éstrico (Baruselli et al., 2007).

A dinâmica folicular das fêmeas *Bos indicus* é caracterizada pela ocorrência de duas, três ou quatro ondas de desenvolvimento folicular (Bó et al., 2003; Sartori et al., 2010). No entanto, existem relatos que descrevem uma maior incidência de ciclos de 3 ondas (Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000, citados por Baruselli et al., 2007). Trabalhos desenvolvidos em novilhas Nelore (Mollo et al., 2007), em vacas da raça Gir (Gambini et al., 1998; Viana et al., 2000) e em vacas Brahman (Zeitoun et al., 1996) demonstraram uma predominância de três ondas, identificando também animais com duas, quatro e cinco ondas (Sartori et al., 2010).

Analogamente ao que acontece com as fêmeas *Bos taurus*, a duração média de cada ciclo éstrico foi positivamente correlacionada com o número de ondas que ocorre durante cada intervalo inter-éstrico (Bó et al., 2003; Sartori et al., 2010). Um dos primeiros estudos realizados em animais de raça Nelore e desenvolvido por Figueiredo et al. (1997), citados por Sartori & Barros (2011), relata que a duração do ciclo éstrico foi em média de 20,7 (n = 20) e de 22,0 (n = 14) dias, para ciclos de duas e três ondas, respectivamente. Em animais com ciclos éstricos de três ondas, a terceira onda folicular tende a surgir mais cedo em *Bos indicus* que em *Bos taurus* (Bó et al., 2003).

Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam um maior número de folículos, por cada onda de crescimento folicular, que fêmeas *Bos taurus* (Baruselli et al., 2007; Sartori et al., 2010; Sartori & Barros, 2011). Esta característica tem uma influência prática directa na eficiência da técnica de transferência de embriões e na produção *in vitro* de embriões (PIV), através de aspiração folicular transvaginal eco-guiada (*Ovum Pick-Up*, OPU), indicando vantagem das fêmeas zebuínas sobre as fêmeas taurinas (Baruselli et al., 2007; Sartori & Barros, 2011). Num trabalho realizado por Carvalho et al. (2007), citados por Baruselli et al. (2007), as fêmeas *Bos indicus* recrutaram cerca de 33,4 folículos, enquanto as fêmeas *Bos taurus*, apenas 25,4. Noutro ensaio, Ginther et al. (1996), citados por Sartori & Barros (2011), encontraram no início de cada onda folicular, aproximadamente 24 pequenos folículos ântricos (3-5mm) em bovinos *Bos taurus*. Buratini et al. (2000), citados por Sartori & Barros (2011), registaram cerca de 50 pequenos folículos nos ovários de novilhas da raça Nelore.

Diferenças significativas na população de folículos, na altura da emergência folicular, entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, podem ser associadas às concentrações circulantes mais elevadas de insulina e IGF-1, nas fêmeas *Bos indicus* (Bó et al., 2003; Sartori et al., 2010; Sartori & Barros, 2011).

1.2.3. Desvio folicular e selecção do folículo dominante

Após a emergência da onda folicular, existe um mecanismo de selecção, que permite que apenas um folículo se torne dominante, inibindo no ovário, o crescimento de outros folículos (Sartori et al., 2010). Esse desvio folicular é definido pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou interrupção no crescimento dos outros (Baruselli et al., 2007; Gimenes et al., 2008; Sartori et al., 2010; Sartori & Barros, 2011).

Nos bovinos do tronco holandês (*Bos taurus*), o desvio tem início por volta do dia 2,8 após a emergência, quando o FD atinge em média 8,5-9,0 mm de diâmetro e o folículo subordinado, 7,2-8,0 mm (Baruselli et al., 2007; Gimenes et al., 2008; Sartori et al., 2010; Sartori & Barros, 2011). Em novilhas da raça Nelore (*Bos* indicus), o diâmetro do FD (6,2 mm) e do maior folículo secundário (5,9 mm) no momento do desvio (2,5 dias após a

ovulação) parece ser menor do que é relatado para bovinos Holandeses (Gimenes et al., 2008). Da mesma forma, Bastos et al. (2010), citados por Sartori et al. (2010), verificaram que o desvio folicular ocorria quando o maior folículo em desenvolvimento atingia 7,0 ± 0,2 e 8,9 ± 0,4 mm, em vacas Nelore não lactantes e em vacas da raça Holandesa, respectivamente.

Embora o tamanho do folículo na altura do desvio difira substancialmente entre as raças, o tempo em que esse desvio ocorre, em fêmeas *Bos indicus*, durante a primeira onda folicular em relação à ovulação anterior (2,3-2,8 d) foi semelhante ao relatado para os bovinos *Bos taurus* (Sartori et al., 2010). Na verdade, num estudo realizado por Bastos et al. (2010), citados por Sartori et al. (2010) que comparou animais da raça Nelore com outros da raça Holandesa, verificaram que o desvio ocorria, em média, 2,3 dias após a ovulação, independente da raça.

É possível então afirmar que os diâmetros do FD e do folículo subordinado são menores em fêmeas *Bos indicus,* que nas *Bos taurus*, e que a divergência folicular nas *Bos indicus* ocorre com diâmetros inferiores aos reportados para as *Bos taurus* (Baruselli et al., 2007). No entanto, há excepções em ambas as subespécies.

1.2.4. Aquisição da capacidade ovulatória

Embora o desvio folicular ocorra nas fêmeas *Bos indicus* quando o FD atinge cerca de 5 a 7 mm de diâmetro, em comparação com os 8 a 9 mm de diâmetro das *Bos taurus*, é possível que um crescimento adicional seja necessário para que o FD adquira capacidade ovulatória, em ambas as subespécies (Sartori et al., 2010). Num estudo realizado por Sartori et al. (2001), citados por Sartori et al. (2010), verificou-se que vacas da raça Holstein, com folículos entre os 7 e 8,5 mm de diâmetro não ovulavam, mesmo após a administração de doses elevadas de LH (40 mg). No entanto, 80% das vacas com folículos ≥ 10 mm ovularam após a administração daquela hormona. Dessa forma, concluíram que nas vacas Holandesas, a capacidade ovulatória só ocorria, após os folículos alcançarem, pelo menos, os 10 mm de diâmetro.

Nas novilhas *Bos indicus*, a capacidade ovulatória foi adquirida quando o FD atingia um diâmetro de pelo menos 7,0 a 8,4 mm (média de 7,6 mm). A administração de 25 mg de LH induziu a ovulação em 33, 80 e 90% das fêmeas com folículos com 7.0-8.4, 8.5 a 10 e >10 mm de diâmetro, respectivamente (Gimenes et al., 2008).

1.2.5. O tamanho máximo do folículo ovulatório/dominante e do CL

Outra diferença fisiológica entre *Bos taurus* e *Bos indicus* está relacionada com o diâmetro máximo alcançado pelo FD em cada onda de crescimento folicular (Baruselli et al., 2007). Em bovinos da raça Holandesa, folículos ovulatórios de 12 e 22 mm foram relatados em novilhas e vacas. Da mesma forma, mas com uma menor variação, folículos ovulatórios com

diâmetros entre 10 a 13 mm de diâmetro foram registados em fêmeas da raça Nelore (Sartori & Barros, 2011).

Em fêmeas *Bos taurus,* com duas ondas de crescimento folicular, foram descritos diâmetros máximos de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda, respectivamente (Ginther et al., 1989). Já nas *Bos indicus*, os diâmetros relatados foram de 11,3 e 12,1 mm, respectivamente (Figueiredo et al., 1997, citados por Baruselli et al., 2007; Sartori et al., 2010). Para as fêmeas com três ondas de crescimento folicular os diâmetros máximos foram de 16,0, 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1989) e de 10,4, 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus* (Figueiredo et al., 1997, citados por Baruselli et al., 2007).

A partir destes dados é possível verificar que os diâmetros do FD e do folículo ovulatório em zebuínos são menores que nos taurinos (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Baruselli et al., 2007). Este facto pode ser explicado pelas diferenças encontradas entre as duas subespécies, no que diz respeito à taxa de crescimento dos folículos. Esta taxa foi menor em bovinos da raça Nelore (0,9 mm/dia), que em raças europeias (1,1-2,0 mm/dia) (Sartori & Barros, 2011).

Devido à correlação positiva entre o tamanho do folículo ovulatório e o tamanho do CL, não é de estranhar que o volume do CL em vacas Nelore seja também menor que nas raças europeias (Sartori & Barros, 2011). Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro, ao passo que nas fêmeas taurinas são relatados diâmetros entre os 20 e 30 mm (Baruselli et al., 2007). Num estudo realizado por Carvalho et al. (2008), a cerca de 10 dias após a ovulação, os CLs de novilhas *Bos indicus* revelaram-se menores que os de novilhas *Bos taurus* (15,3 versus 18,4 mm de diâmetro). Randel (1984), citado por Bó et al. (2003), lançou a hipótese de que essa menor dimensão do CL, observado no gado *Bos indicus,* era resultado de uma menor resposta ao pico de estrogénios, de um menor pico pré-ovulatório de LH e de um tempo diferente nos eventos endocrinológicos que conduzem à ovulação.

1.2.6. Hormonas circulantes

Da mesma maneira, há relatos que afirmam que a quantidade de P_4 produzida pelo CL também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (Segerson et al., 1984, citados por Baruselli et al., 2007). Segundo Randel (1976), citado por Sartori et al. (2010), as fêmeas zebuínas puras e cruzadas, apresentam uma menor concentração de P_4 por grama de tecido lúteo que as taurinas. Para além disso, Figueiredo et al. (1997), citados por Sartori & Barros (2011), observaram que a média geral na concentração de P_4, foi menor em novilhas (4,9 ± 0.2 ng/mL) do que em vacas (6,4 ± 0,2 ng/mL).

Segerson et al. (1984), citados por Sartori & Barros (2011), detectaram maiores concentrações de E_2 e de P_4 no soro de animais da raça Angus que em fêmeas da raça Brahman. Estes resultados podem ser atribuídos às diferenças encontradas no tamanho do FPO e do CL, entre as duas subespécies.

1.2.7. Comportamento éstrico

O estro ou período de receptividade sexual é um período bem definido, que ocorre em vacas não gestantes uma vez a cada 18-24 dias (Ball & Peters, 2004f; O'Connor, 2007; Vann, 2015). Este período tem uma duração entre os 30 minutos (min) e as 27 horas (h) em *Bos taurus* e cerca de 1 a 20 h em *Bos indicus* (Sartori & Barros, 2011). Mizuta (2003), citado por Sartori & Barros (2011), verificou que a duração do cio em fêmeas *Bos indicus* era menor que em fêmeas *Bos taurus* (12,9 ± 2,9 horas, em Nelore vs. 16,3 ± 4,8 horas, em Angus). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferenças entre estas duas raças (Nelore, 27,1 ± 3,3 h vs. Angus, 26,1 ± 6,3 h).

As fêmeas *Bos indicus* geralmente apresentam um comportamento de cio muito característico, o que faz com que a sua detecção seja uma tarefa muito difícil (Bó et al., 2003). Para além de apresentarem cios de duração mais curta (aproximadamente 10 horas), mais de 50% das manifestações de cio iniciam-se no período nocturno (entre as 18:00 e as 6:00 h), dificultando assim o maneio e, a eficácia da sua detecção (Baruselli et al., 2007).

Para além da duração, a intensidade do cio em fêmeas *Bos indicus* parece menor quando comparada com a de raças taurinas. Galina et al. (1982), citados por Bó et al. (2003), compararam a intensidade dos sinais de cio entre animais cruzados (Brahman × Charolês) e animais puros (Charolês). Os autores relataram então, um menor número de montas em vacas cruzadas (1,6 montas/h) que em vacas puras (2,8 montas/h).

Todos estes aspectos em conjunto (menor taxa de exibição de cio, menor duração do cio e maior percentagem de animais a exibirem o cio durante a noite) tornam a detecção do cio mais complicada e, consequentemente criam obstáculos à eficácia da IA em bovinos da raça Nelore. Este problema pode, no entanto, ser ultrapassado através da utilização da técnica de IATF, quando a detecção dos cios se torna dispensável (Sartori & Barros, 2011).

1.2.8. Pós-parto

A duração da gestação em fêmeas *Bos indicus* (292 dias, em média) é mais longa que a de animais *Bos taurus* (282 dias, em média). Portanto, para obtenção de intervalo entre partos de 12 meses, o período de serviço (intervalo parto/concepção) naquelas deve ser 10 dias inferior ao das fêmeas *Bos taurus*, para que a eficiência reprodutiva seja semelhante (Baruselli et al., 2007).

Os padrões de secreção das gonadotrofinas, no período pós-parto, também diferem entre os dois grupos raciais. Nas mesmas condições de maneio, fêmeas *Bos taurus* (Hereford × Shorthorn) apresentaram concentrações plasmáticas de LH mais elevadas (0,7 ± 0,1 ng/mL) que vacas Brahman (0,6 ± 0,1 ng/mL), 30 dias após o parto, sendo que esta diferença parece aumentar ao longo do tempo (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2007). Estes dados sugerem que o APP, nesse tipo de fêmeas, está ligado ao comprometimento da libertação de LH, responsável pela continuidade do crescimento folicular e pela indução da ovulação

do FD e não, à deficiência de FSH, uma vez que se verifica crescimento folicular até à fase de divergência. Sendo assim, especula-se que nas fêmeas zebuínas, em condições de anestro profundo, os folículos não atinjam diâmetros superiores a 6 mm, ao contrário das fêmeas taurinas, que nas mesmas condições de anestro, os folículos podem crescer até diâmetros superiores (8,5 mm) (Baruselli et al., 2007).

Tabela 3 - Principais diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus.*

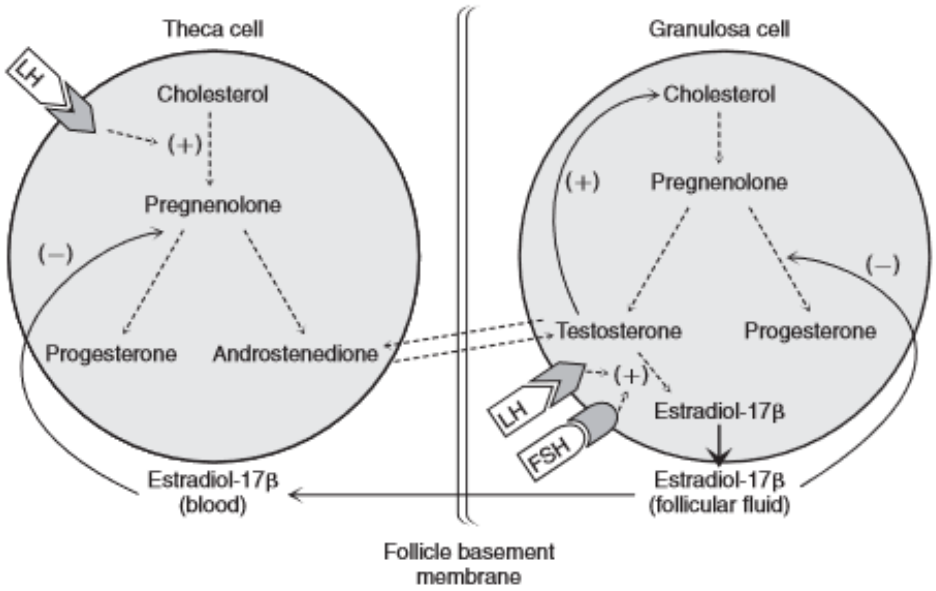
	Bos indicus	**Referências**	***Bos taurus***	**Referências**
Puberdade (meses)	15-27	Amstalden & Williams (2015)	6-12	Forde *et al.* (2011)
Gestação (dias)	292	Paschal *et al.* (1991)	282	Paschal *et al.* (1991)
Nº de ondas foliculares	2 a 4 (maior incidência de 3)	Sirois e Fortune (1988) Rhodes *et al.* (1995) Figueiredo *et al.* (1997)	2 a 3	Sirois e Fortune (1988) Savio *et al.* (1998) Wolfenson *et al.* (2004)
Nº de folículos recrutados	33,4/50	Carvalho *et al.* (2007) Buratini *et al.* (2000)	25,4/24	Carvalho *et al.* (2007) Ginther *et al.* (1996)
Concentração de IGF-1	>	Bó *et al.* (2003) Sartori & Barros (2011)	<	Bó *et al.* (2003) Sartori & Barros (2011)
Dia da divergência folicular (dias)	2,5 a 2,7 pós-ovulação	Sartorelli *et al.* (2005) Gimenes *et al.* (2005) Castilho *et al.* (2006)	2,8 após a emergência	Ginther *et al.* (1996)
Diâmetro do folículo dominante na divergência (mm)	6,2	Gimenes *et al.* (2008)	8,5 a 9	Ginther *et al.* (1996)
Diâmetro do maior folículo subordinado na divergência (mm)	5,9	Gimenes *et al.* (2008)	7,2 a 8	Ginther *et al.* (1996)
Diâmetro que adquire a capacidade ovulatória (mm)	7 a 8,5	Gimenes *et al.* (2008)	10	Sartori *et a*l. (2001)
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	11,3 a 12,1	Figueiredo *et al.* (1997)	12,9 a 17,1	Ginther *et al.* (1989)
Taxa de crescimento do FD (mm/dia)	0,9	Figueiredo *et al.* (1997)	1,1 a 2	Sirois e Fortune (1988)
Diâmetro do CL (mm)	17 a 21	Rhodes *et al.* (1995) Figueiredo *et al.* (1997)	20 a 30	Ginther *et al.* (1989) Kastelic *et al.* (1990)
Quantidade de P4 produzida pelo CL (ng/g)	<	Randel (1976)	>	Randel (1976)
Concentração plasmática de P4 e E2	<	Segerson *et al.* (1984)	>	Segerson *et al.* (1984)
Comportamento de cio	Duração (horas): 12,9±2,9 Intensidade (montas/h): 1,6	Mizuta (2003) Galina *et al.* (1982)	Duração (horas): 16,3±4,8 Intensidade (montas/h): 2,8	Mizuta (2003) Galina *et al.* (1982)

II. O DIÂMETRO FOLICULAR E A SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE GESTAÇÃO

2.1. PRODUÇÃO DE ESTRADIOL PELO FOLÍCULO EM CRESCIMENTO E SEUS EFEITOS

A síntese de E_2 pelo FD é dependente da produção de androgénios pelas células da teca e subsequente aromatização dos mesmos em estrogénios, nas células da granulosa, num modelo conhecido como *"two cells / two gonadotrophins"* (Fortune & Quirk, 1988, citados por Forde et al., 2011) (Figura 6). Segundo este modelo, a LH liga-se às células da teca e estimula a produção de androgénios (testosterona) a partir do colesterol que, posteriormente se difundem através da membrana basal, atingindo as células da granulosa. A ligação da FSH às células da granulosa aumenta a actividade da aromatase, que converte os andrógenos em E_2 (Dorrington et al., 1975, citados por Forde et al., 2011).

Figura 6 - Modelo de produção de Estradiol (*two cells / two gonadotrophins*) pelas células da teca e da granulosa. Retirado de Stevenson (2007).



Como hormona esteróide gonadal clássica que é, o E_2 é responsável por determinadas alterações fisiológico-estruturais ao nível do trato genital. Torna-o edematoso, tónico e altamente secretor, especialmente através da produção de muco pelas glândulas do colo do útero, levando a um corrimento mucóide característico (Roelofs et al., 2010).

Nas espécies em que o sémen é depositado na porção anterior da vagina, tais como ruminantes, coelhos, gatos e primatas, incluindo o homem, o cérvix e o muco desempenham um papel crítico na reprodução. O fluido vaginal/cervical é o primeiro meio fisiológico que os espermatozóides encontram no trato genital feminino, devendo ser ultrapassado, para que estes atinjam o local da fertilização (Roelofs et al., 2010). Na fase folicular do ciclo éstrico, o muco cervical torna-se mais abundante, translúcido, aquoso, menos viscoso e assim, mais fácil de atravessar pelos espermatozóides. Em contrapartida, na fase lútea do ciclo éstrico, o muco torna-se escasso e viscoso e, por conseguinte, desfavorável à penetração dos

espermatozóides. As propriedades físicas do muco resultam da presença de glicoproteínas macromoleculares, também conhecidas como mucinas; elas constituem uma rede tridimensional ao longo dos filamentos de muco (Roelofs et al., 2010). A acumulação de leucócitos nas camadas sub-epiteliais do endométrio congestionado é outra característica da iminência de cio e é principalmente regulada por hormonas esteróides produzidas nos ovários. Tais células, especialmente os leucócitos polimorfo-nucleares, são mobilizadas para o lúmen uterino das fêmeas durante o estro, desempenhando um papel de protecção, fagocitando espermatozóides mortos, bactérias e outros detritos celulares (Roelofs et al., 2010).

Após a luteólise, as concentrações séricas de P_4 começam a diminuir enquanto as de E_2, produzido pelo FD em crescimento, aumentam. A alteração na concentração dessas duas hormonas (P_4 e E_2) é responsável pelo comportamento de cio (evidente durante o período de estro) e pelo aumento pré-ovulatório de GnRH e LH (Sartori & Barros, 2011), podendo essas alterações, ter início um ou dois dias antes do estro, induzindo mudanças comportamentais nos animais (Ball & Peters, 2004d). O cio ocorre devido à influência específica das hormonas esteróides produzidas pelos ovários sobre os centros comportamentais no cérebro dos mamíferos (Roelofs et al., 2010). Após o início do estro, o ambiente uterino é modificado de forma a melhorar a motilidade e a longevidade dos espermatozóides. Desta forma, as concentrações de E_2 no pró-estro, a partir de fontes endógenas ou exógenas, podem desempenhar um papel importante no transporte e na viabilidade do esperma até à altura da ovulação e da fertilização (Sá Filho, Santos, Ferreira, Sales & Baruselli, 2011).

2.2. RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

Após a ovulação, o oócito é recolhido pelas fímbrias do oviduto e transportado ao longo deste até ao local onde se dá a fertilização. Este processo ocorre normalmente na zona da ampola, perto da junção com o istmo. De seguida, o embrião é transportado até ao útero (4-5 dias, após a ovulação), possivelmente por uma combinação de movimentos ciliares e de contracções musculares, sob o controlo de hormonas esteróides produzidas nos ovários (estrogénio e P_4) (Ball & Peters, 2004c), tendo vida livre no lúmen uterino até ao dia 20 da gestação (Gordon, 2005b).

Por volta do dia 16 ou 17, o embrião sinaliza a sua presença à mãe, através de um processo designado como reconhecimento materno da gestação (RMG) (Stevenson, 2007). Este pode ser definido como o processo pelo qual, um sinal bioquímico é gerado para evitar a regressão lútea, permitindo assim que o CL persista e continue a segregar P_4 em níveis adequados para manter a gestação (Gordon, 2005b; Lemley, Camacho & Vonnahme, 2015). Este mecanismo de RMG envolve o sistema imunitário, vascular e endócrino (Gordon,

2005c) e está relacionado com o crescimento inicial do embrião, o qual se for inadequado, resultará em fracasso (Gordon, 2005b).

Nos bovinos, o RMG envolve a secreção pelo embrião de uma proteína, designada por interferão-tau (INF-t), que sinaliza alterações na produção de várias prostaglandinas endometriais ($PGF_{2\alpha}$ e PGE_2), sendo por isso responsável pela prevenção da luteólise (efeito antiluteolítico), mantendo o CL funcional (efeito luteotrópico), ou seja, com capacidade de produzir P_4 (Youngquist & Threlfall, 2007; Lemley et al., 2015). O INF-t actua através da inibição da síntese de receptores endometriais de oxitocina, os quais são responsáveis pela libertação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio – efeito antiluteolítico. Na base deste mecanismo, parece estar uma regulação negativa dos receptores de E_2 (Gordon, 2005c). A magnitude deste efeito antiluteolítico depende da área do endométrio que está em contacto com o embrião, bem como da quantidade de INF-t que é segregado pelo mesmo (Machado, Bergamaschi, Barbosa, de Oliveira & Binelli, 2008). A secreção do INF-t pelas células trofoblásticas embrionárias é mais elevada entre os dias 15 e 17 e prolonga-se até ao dia 28 da gestação (Lemley et al., 2015).

A $PGF_{2\alpha}$ causa a diminuição do fluxo sanguíneo para o parênquima ovárico e alterações morfológicas ao nível do CL que reduzem, tanto o número das células lúteas pequenas, como o tamanho das células lúteas grandes. Além disso, está também envolvida na sinalização intracelular da apoptose das células lúteas grandes, estimulando a produção local de $PGF_{2\alpha}$, resultando assim na luteólise (Kasimanickam, 2015). A cultura *in vitro* de células do endométrio bovino, sujeitas a concentrações crescentes de INF-t mostraram a produção preferencial de PGE_2 em comparação com a de $PGF_{2\alpha}$. Concentrações elevadas de INF-t produzidas pelo feto aumentam selectivamente a proporção de PGE_2 em relação à $PGF_{2\alpha}$. Este facto estabelece um efeito antiluteolítico do INF-t combinado com um efeito luteotrópico da PGE_2, levando a um prolongamento da vida útil do CL, adequado ao estabelecimento da gestação (Kasimanickam, 2015).

Uma resposta inadequada do endométrio relativamente ao INF-t parece ser uma das razões principais para a produção inadequada de PGE_2 relativamente à $PGF_{2\alpha}$, estando na base da perda gestacional. Uma proporção elevada de $PGF_{2\alpha}$ em relação a PGE_2 irá estimular a contractilidade uterina e o transporte competitivo de $PGF_{2\alpha}$ para o CL, através do plexo útero-ovárico, iniciando assim a regressão lútea. Juntos, contractilidade uterina e regressão lútea, levarão ao fracasso da gestação (Lemley et al., 2015). Se o embrião morrer antes do dia 16, ou seja, antes do RMG, a fêmea bovina irá revelar um retorno ao cio em 18 a 24 dias, como se a gestação nunca tivesse ocorrido. No entanto, se o embrião morrer após aquele período, ela poderá sofrer um atraso para o próximo cio (Stevenson, 2007).

Em algumas espécies, por exemplo na porca e na cabra, o CL é necessário para manter a gestação durante todo o seu período. No entanto, na vaca, este só é necessário durante os primeiros 200 dias de gestação. Vacas que foram ovariectomizadas depois dos 200 dias de

gestação mantiveram a gestação até ao fim. Na vaca gestante, uma importante fonte de P_4 é produzida pelas glândulas supra-renais e pela placenta (Ball & Peters, 2004c). A prevenção da regressão do CL e a secreção contínua e adequada de P_4 são vitais para a manutenção de uma gestação até termo (Lemley, Camacho & Vonnahme, 2015). O alvo primário da P_4 é o trato reprodutivo. A amplitude da sua secreção pode influenciar o ambiente uterino, através da inibição da divisão mitótica ao nível do endométrio, da indução da diferenciação do estroma e da estimulação de secreções glandulares pelo epitélio uterino, que são essenciais para o desenvolvimento precoce do embrião (Lemley et al., 2015). Para além destas acções, a P_4 parece ter também alguma influência na contractilidade uterina. Concentrações adequadas de P_4 promovem um relaxamento uterino capaz de manter uma gestação até ao seu termo (Lemley et al., 2015).

2.3. A IMPORTÂNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR

O mecanismo pelo qual o tamanho do FPO pode afectar negativamente a taxa de gestação, num programa de IATF pode ser atribuído à ovulação de um oócito incompetente, a um ambiente uterino inadequado, ou a ambos (Busch et al., 2008). Segundo Mesquita et al. (2014), o tamanho do FPO altera o ambiente endócrino peri-ovulatório (isto é, as concentrações de E_2 durante o pró-estro e as concentrações de P_4 durante o diestro) e actua sobre o útero alterando a expressão génica do endométrio.

Diversos trabalhos têm encontrado uma relação negativa entre a concentração de P_4, durante o protocolo de sincronização da ovulação e a taxa de gestação à IATF, em novilhas Nelore pós-púberes e em vacas lactantes e não lactantes cíclicas (Peres et al., 2009; Martins et al., 2014). Segundo estes autores, as elevadas concentrações de P_4 durante o protocolo de sincronização, promovem a redução da frequência dos pulsos de LH, o que diminui o desenvolvimento do FD e, subsequentemente, o diâmetro do folículo à IATF, comprometendo dessa forma a fertilidade. A diminuição das concentrações de E_2, antes da ovulação e da P_4, no diestro subsequente, parecem estar na base desta diminuição de fertilidade (Martins et al., 2014). As estratégias que visam melhorar o desenvolvimento folicular após a fase de divergência, podem então aumentar a fertilidade em bovinos submetidos a protocolos de IATF.

Em bovinos *Bos taurus*, sujeitos a protocolos que utilizam a GnRH como indutor da ovulação, a presença de um FD com mais de 12 mm, na altura da indução da ovulação, está associada a taxas de gestação mais elevadas, em comparação com um folículo de dimensões inferiores a 12 mm (Busch et al., 2008). Perry et al. (2005) afirmaram que, com idêntico protocolo, a ovulação de folículos com dimensões inferiores ou iguais a 11 mm diminuíam a taxa de gestação e aumentavam a incidência da mortalidade embrio-fetal. A ovulação induzida pela GnRH, de folículos fisiologicamente imaturos, tem um impacto negativo na taxa de gestação e na sobrevivência embrio-fetal. No entanto, a ovulação

espontânea (sem indução hormonal) de folículos de diâmetro ≤ 11 mm não apresenta nenhum efeito na taxa de gestação ou na sobrevivência embrio-fetal (Perry et al., 2005). Segundo estes autores, os folículos sujeitos a ovulação espontânea fazem-no numa ampla gama de tamanhos, quando adquirem a maturidade fisiológica.

A ovulação de folículos grandes, através de indução hormonal leva à formação de um CL de grandes dimensões que, consequentemente segrega maiores quantidades de P_4, sendo por isso de esperar uma maior fertilidade (Pfeifer, de Souza Leal, Schneider, Schmitt & Corrêa, 2012). No entanto, Martins et al. (2014) registaram uma diminuição da taxa de concepção em novilhas *Bos indicus* que apresentaram folículos grandes à IATF (≥ 15,8 mm), provavelmente devido ao aumento da idade folicular. Segundo Pfeifer et al. (2012), folículos que crescem sob um ambiente de baixa concentração de P_4 tendem a tornar-se persistentes, estando altamente associados a uma diminuição da fertilidade, provavelmente por redução da viabilidade dos oócitos (Pfeifer et al., 2012).

Pode concluir-se então, que existe um compromisso prático entre a concentração de P_4, durante um protocolo de sincronização e a qualidade do oócito produzido. Segundo Vasconcelos et al. (2013), a optimização do tamanho do folículo em programas de IATF é claramente um equilíbrio complicado entre a qualidade do oócito, a adequada concentração de E_2 (na vizinhança da IA) e, a adequada concentração de P_4, após a IA.

2.3.1. O ambiente uterino peri-ovulatório

Os requisitos maternos para o estabelecimento de uma gestação normal incluem, a ovulação de um oócito competente, uma produção adequada de P_4 e a promoção de um ambiente tubo-uterino apropriado (Peres et al., 2009). Só dessa forma, e através de uma sincronia perfeita entre o embrião e o útero, é que aquele pode encontrar as condições ideais para se poder desenvolver (Perry et al., 2014).

Durante a fase final do crescimento folicular e durante o estro, fecundação e fase inicial do desenvolvimento embrionário, o oviduto, sob controlo hormonal específico, contribui para a secreção de determinadas macromoléculas (*oestrogen dependent glycoproteins* – OGPs) que optimizam o microambiente uterino para a maturação e transporte de gâmetas, para a fertilização e para o desenvolvimento embrionário. Estas funções complexas são dependentes da actividade do epitélio secretor, que reveste as pregas mucosas longitudinais do oviduto, e que é controlada por esteróides ováricos: E_2 e P_4 (Buhi, 2002). Sob acção do E_2, o epitélio tubárico sintetiza e secreta OGPs. Estas macromoléculas, ao interagirem com os espermatozóides, têm a capacidade de afectar a motilidade e viabilidade destes últimos, participando também na capacitação e na reacção acrossómica. Ao nível dos oócitos, os seus efeitos incluem a optimização da capacidade de penetração do espermatozóide, a melhoria da taxa de fertilização e a diminuição da polispermia (Buhi, 2002).

Dados actuais indicam que um maior FPO e uma maior duração do pró-estro, bem como concentrações mais elevadas de E_2 antes da ovulação e, de P_4 após a ovulação, têm efeitos benéficos sobre a fertilidade de bovinos de carne (Ramos et al., 2015). Concentrações adequadas de P_4 após a ovulação são necessárias para estimular a secreção endometrial, o desenvolvimento embrionário, o reconhecimento materno e a manutenção da gestação (Peres et al., 2009). Para além da P_4, também o E_2 desempenha um papel importante no estabelecimento da receptividade uterina (Perry et al., 2014).

O controlo do ambiente *redox* uterino, por parte dos esteróides sexuais, parece estar envolvido no processo de receptividade uterina (Ramos et al., 2015). No seu estudo, estes autores concluíram que o ambiente intra-uterino de vacas pertencentes ao grupo LF-LCL (grande folículo – grande CL) exibiu maior actividade antioxidante do que o de vacas pertencentes ao grupo SF-SCL (pequeno folículo – pequeno CL). Especularam então que a receptividade uterina e a fertilidade estavam associadas a um ambiente *redox* óptimo, tal como o evidenciado nos animais do grupo LF-LCL. Segundo eles, a regulação da capacidade de redução, fornecida principalmente por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutationa peroxidase (GPx), desempenha um papel importante, pois os metabolitos do processo oxidativo participam em diversos processos celulares, tais como a fosforilação proteica, a hidrólise de fosfolípidos, a activação de factores de transcrição e a inibição das fosfatases. Estudos com E_2 e P_4 têm demonstrado que estes dois esteróides ováricos regulam a actividade e os níveis da GPx em ratos, bem como a actividade da SOD, CAT e GPx em ovinos (Ramos et al., 2015). Portanto, E_2 e P_4 actuando em conjunto, regulam a actividade de diferentes moléculas importantes para o controlo do ambiente *redox* do útero e de outros tecidos e órgãos.

2.3.1.1. O Estradiol

O sucesso da gestação é, segundo Perry et al. (2014), influenciado pelo diâmetro do folículo ovulatório e pelas concentrações pré-ovulatórias de E_2. Estudos recentes têm mostrado uma associação positiva entre as concentrações pré-ovulatórias de E_2 e a duração do pró-estro sobre o ambiente uterino e a fertilidade (Ramos et al., 2015).

O E_2, produzido pelo folículo maduro, tem um papel importante no estabelecimento da receptividade uterina, uma vez que apresenta acção directa sobre a secreção de determinadas glicoproteínas (as OGPs) e na regulação do ambiente uterino (Sá Filho et al., 2011; Perry et al., 2014). Para além disso, também parece estar associado à síntese dos receptores de P_4 no endométrio (Zelinski et al., 1980, citados por Busch et al., 2008). De acordo com Perry et al. (2014), o aumento das concentrações pré-ovulatórias de E_2 resultaram em fertilidade mais elevada, bem como na melhoria da qualidade e da viabilidade do embrião. Segundo Peres et al. (2009), concentrações adequadas de E_2 antes da ovulação são necessárias: para a melhoria da capacidade de resposta da hipófise ao

estímulo da GnRH (melhorando a secreção pré-ovulatória de LH); para proporcionar um ambiente tubo-uterino adequado; e para promover alterações fisiológicas nas células da granulosa, necessárias à função lútea subsequente.

Também tem sido sugerido que as concentrações de E_2 antes da ovulação têm a capacidade de influenciar o transporte e a viabilidade do esperma ao longo do trato reprodutivo da fêmea, até à altura da ovulação e da fertilização (Perry et al., 2014). Segundo Perry & Perry (2008), este facto deve-se a uma diminuição no pH uterino, fruto de um aumento das concentrações de E_2 na altura do estro. De acordo com Jones & Bavister (2000) citados por Perry & Perry (2008), a diminuição do pH provoca uma perda completa da motilidade dos espermatozóides, numa altura em que a função metabólica dos mesmos se encontra diminuída. Esta perda de motilidade revela-se, então, importante, pois é acompanhada por um aumento do tempo de semivida dos espermatozóides. O transporte eficiente destes, ao longo do trato reprodutor feminino requer assim que a fêmea esteja em cio ou sob a influência de estrogénios, uma vez que, após a maturação final do esperma, os espermatozóides apresentam uma função metabólica baixa, estando completamente dependentes do ambiente envolvente (Perry & Perry, 2008).

Vasconcelos et al. (2001) e Sá Filho et al. (2009) verificaram que vacas ovulando folículos de menores dimensões apresentavam menores concentrações de E_2 antes da ovulação. Segundo Sá Filho, Crespilho, Santos, Perry & Baruselli (2010), a presença de um folículo maior na altura da IATF foi associada a uma mais intensa manifestação de cio, a uma maior taxa de ovulação e a uma maior taxa de gestação. Num trabalho realizado por Perry et al. (2014), em vacas *Bos taurus*, a taxa de gestação foi superior nas fêmeas que exibiram cio próximo da altura da IA, do que nas outras que não o fizeram. Em ambos os tipos de vaca (aleitantes e não aleitantes), houve uma relação positiva entre a manifestação de cio ($p < 0,05$), o tamanho do folículo e a concentração de E_2. No entanto, não houve nenhuma relação linear ($p > 0,05$) entre o tamanho do folículo e a concentração de E_2, entre vacas que não exibiram cio. Portanto, a diminuição da taxa de gestação observada em vacas não detectadas em cio parece resultar da produção insuficiente de E_2 durante o período pré-ovulatório (Perry et al., 2014). Também Sá Filho et al. (2011), no seu estudo com vacas *Bos indicus*, demonstraram a importância da manifestação de cio, determinado com base na remoção da marca na base da cauda, na taxa de gestação de vacas *Bos indicus* aleitantes, sujeitas a protocolos de IATF à base de P_4 e E_2. As vacas que manifestaram sinais de cio apresentaram um maior diâmetro folicular na altura de remoção do dispositivo intravaginal de P_4, maior diâmetro folicular à IATF, maior taxa de ovulação, melhor função lútea subsequente e, maior taxa de gestação, do que aquelas que não manifestaram cio.

2.3.1.2. A Progesterona

A P_4 desempenha um papel fundamental em todo o eixo reprodutivo de fêmeas mamíferas, incluindo os bovinos, sendo essencial para o sucesso reprodutivo. Ela é responsável pela competência do oócito, bem como pela receptividade uterina e manutenção da gestação (Fair & Lonergan, 2012).

O tamanho do folículo ovulatório, influência de forma consistente as concentrações de P_4 durante o diestro, provavelmente por via do aumento do tamanho do CL subsequente, bem como, a taxa de concepção (Peres et al., 2009; Martins et al., 2014). Num trabalho realizado por Pfeifer et al. (2012), vacas que apresentaram um folículo ovulatório de diâmetro >19 mm tiveram um maior CL que vacas que ovularam um folículo de dimensões <15 mm. Adicionalmente, a concentração de P_4 após a ovulação foi inferior em vacas que ovularam folículos com dimensões inferiores a 11,5 mm, em comparação a vacas que ovularam folículos maiores (Vasconcelos et al., 2001). Nos búfalos, o tamanho do CL foi também positivamente correlacionado com o diâmetro do FPO (Rahman, Shohag, Kamal, Bari & Shamsuddin, 2012).

Segundo Mesquita et al. (2014), o aumento da secreção de P_4 em vacas que ovulam folículos maiores, deve-se provavelmente ao aumento do tamanho do CL e não a um aumento na expressão de genes lúteos. Ao que parece, a capacidade do CL para produzir P_4 está dependente do número de células da granulosa do folículo ovulatório, o qual está directamente relacionado com o diâmetro folicular (Pfeifer et al., 2012). Segundo estes autores, quanto maior for o folículo, maior será o número de células da granulosa e, por conseguinte, maior será o seu potencial esteroidogénico. Num trabalho realizado por Murdoch & Kirk (1998), em ovinos, folículos em estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram menos células da granulosa e, quando induzidos a ovular, deram origem a CLs de menores dimensões. Para além do menor número de células da granulosa, também um número reduzido de receptores de LH nas células da teca e da granulosa, bem como, uma reduzida capacidade das células da granulosa de sintetizarem uma quantidade adequada de P_4, podem estar na base desta situação (Peres et al., 2009).

Para além destas fundamentações, todas elas consistentes e actuais, houve autores que encontraram uma relação positiva, entre a concentração de E_2 no interior de folículos ováricos humanos e a função lútea subsequente (McNatty et al., 1979, citados por Busch et al., 2008). Nesse trabalho, a capacidade lútea das células da granulosa foi aumentada, quando elas foram recolhidas de folículos com elevada concentração de E_2. Segundo eles, o E_2 parece ser o responsável pela preparação e pela aquisição da função lútea por determinadas células foliculares. Num estudo mais recente, realizado em ovelhas, a secreção de P_4 pelo CL foi atrasada, quando estas foram tratadas com um inibidor da aromatase, antes da indução da ovulação (Benoit et al., 1992, citados por Busch et al. 2008).

Alguns autores sugerem que a concentração de P_4, após a IA, está positivamente relacionada com a fertilidade. Segundo Diskin & Morris (2008) citados por Pfeifer et al., (2012), vacas que apresentam uma elevação mais precoce das concentrações daquela hormona, após a inseminação, têm uma maior hipótese de manter a gestação, do que aquelas que revelam um aumento mais lento e tardio.

A concentração adequada de P_4, durante a fase posterior à ovulação, é importante para a fertilidade, devido à sua acção ao nível da estimulação da secreção endometrial, do desenvolvimento embrionário, do reconhecimento materno da gestação e do estabelecimento e manutenção da gestação (Martins et al., 2014). O crescimento e o desenvolvimento do concepto exigem a acção da P_4 sobre o útero, na regulação da função endometrial. Elevadas concentrações de P_4 no período pós-concepção precoce, foram associadas a um alongamento do concepto de forma mais eficiente (Mesquita et al., 2014), a um aumento na produção de INF-t e a taxas de gestação mais elevadas, em bovinos e ovinos (Lonergan, 2011). Na espécie bovina, a maior percentagem de perdas embrionárias ocorre muito cedo durante a gestação (até ao dia 16), por altura ou mesmo antes da fase do reconhecimento materno da gestação, sendo esta situação atribuível em grande parte, à concentrações inadequadas de P_4 (Lonergan, 2011).

III. A CONDIÇÃO CORPORAL E A SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE GESTAÇÃO

3.1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva de uma exploração de produção de carne ou de leite tem um peso importante na eficiência produtiva e económica dessa mesma exploração (Diskin et al., 2003). O desempenho reprodutivo ideal em vacas de carne é muitas vezes limitado por períodos de APP prolongados, sendo a amamentação e a nutrição, factores importantes na regulação da duração desses mesmos períodos (Ciccioli et al., 2003). O maneio nutricional é pois, um factor importante que controla e afecta a reprodução em vacas de aptidão cárnica (Short & Adams, 1988; Vizcarra, Wettemann, Spitzer & Morrison, 1998; Diskin et al., 2003).

A subnutrição tem uma grande influência sobre o desempenho reprodutivo, afectando a idade à puberdade, o intervalo do APP e a taxa de sobrevivência embrionária (Diskin et al., 2003). Geralmente, as vacas de carne não experimentam um período de BEN, uma vez que não conseguem produzir uma quantidade de leite equivalente ao que as vacas leiteiras produzem. No entanto, precisam de estar em CC adequada para recuperar a ciclicidade normal após o parto, superando o anestro, os ciclos éstricos curtos e o processo de involução uterina, de forma que a cada ano fiquem gestantes (Lamb & Mercadante, 2015).

As fêmeas entram em anestro quando perdem, em média, 22-24% do seu peso corporal inicial (Diskin et al., 2003). A ingestão de nutrientes de forma inadequada ou reduzida está associada à perda de peso corporal, que se manifesta em alterações da pontuação ("*score*") da CC, na diminuição da actividade lútea e na supressão do ciclo éstrico (Vizcarra et al., 1998; Ciccioli et al., 2003). Segundo Diskin et al. (2003), a restrição nutricional moderada ou crónica, a longo prazo, resulta numa redução gradual da taxa de crescimento do FD, na redução do seu diâmetro máximo e na persistência do mesmo. A maior ingestão de nutrientes a seguir ao parto pode aumentar a secreção de LH e aumentar o crescimento folicular, sendo os efeitos da nutrição sobre a reprodução mais pronunciados em vacas magras do que em vacas com uma CC adequada (Ciccioli et al., 2003).

Os efeitos da alimentação têm sido mais comumente observados e medidos usando a energia como variável. No entanto, outras deficiências nutricionais, tais como água, proteínas, vitaminas e minerais também podem afectar a reprodução, mas os seus efeitos não estão ainda bem documentados (Short & Adams, 1988). De igual modo, embora esteja perfeitamente estabelecido que as reservas de energia corporal afectam o desempenho reprodutivo dos bovinos, o seu mecanismo íntimo também não está totalmente esclarecido (Vizcarra et al., 1998).

3.2. NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO DA FÊMEA BOVINA

A relação entre nutrição e reprodução é bidireccional, uma vez que, o *status* reprodutivo pode modificar as necessidades nutricionais e os alimentos assimilados pela vaca que, por sua vez, podem condicionar a sua função reprodutiva (Swecker, 2015). A deficiente ingestão de energia, proteínas, vitaminas, micro-minerais e/ou macro-minerais tem sido associada a um desempenho reprodutivo abaixo do ideal. No entanto, destes efeitos nutricionais sobre a reprodução, a subnutrição é provavelmente o elemento mais importante relacionado com a função reprodutiva nos bovinos (Lamb & Mercadante, 2015).

A vaca de carne mobiliza as suas reservas corporais de forma a colmatar as suas necessidades, através da mobilização de gordura corporal e de reservas proteicas (Anderson & Lewis, n.d.; Swecker, 2015). Os precursores bioquímicos de determinadas hormonas da reprodução são gerados durante essa mobilização de gordura corporal, indicando que algum nível de degradação lipídica é necessária para a síntese adequada dessas hormonas, como a P_4 e os estrogénios (Anderson & Lewis, n.d.). A partição de nutrientes para a produção e reprodução é o resultado de complexas interacções entre a quantidade e a qualidade da dieta, as reservas de nutrientes e a demanda para o crescimento, para o metabolismo e outras funções (Short & Adams, 1988).

3.2.1. Priorização da energia

A utilização de energia metabolizável nos ruminantes para cada estado fisiológico é classificada, por ordem de importância, da seguinte forma: (1) metabolismo basal; (2) actividade; (3) crescimento; (4) reservas de energia; (5) gestação; (6) lactação; (7) reservas de energia adicionais; (8) ciclo éstrico e início da gestação; e (9) reservas excedentárias (Short & Adams, 1988; Machado, Corrêa, Barbosa & Bergamaschi, 2008; Lamb & Mercadante, 2015). A importância dessas funções pode variar um pouco em termos de prioridade absoluta e relativa em determinadas condições, tais como a lactação, gestação e crescimento. No entanto, apenas os nutrientes utilizados para o crescimento (3) e para reservas de energia (4), são os únicos que podem ser mobilizados para outros fins (Short & Adams, 1988). Com base nesta lista de prioridades metabólicas, verifica-se então que a função reprodutiva ocupa uma posição delicada, sendo portanto fácil de entender o porquê da reprodução ser altamente afectada pelo *status* energético do animal (Lamb & Mercadante, 2015).

3.2.2. Exigências nutricionais das vacas de carne

As exigências nutricionais das vacas de carne variam de acordo com o seu estado reprodutivo (Anderson & Lewis, n.d.; Swecker, 2015):

1) Do parto à concepção (82 dias): a função reprodutiva durante este período inclui a involução uterina, a recuperação da ciclicidade normal e a lactação. As exigências nutricionais são maiores durante este período devido à lactação. Dessa forma, a maioria das vacas utiliza a energia dos seus tecidos para atender às suas necessidades, pois não conseguem consumir nutrientes em quantidade suficiente, em virtude de uma reduzida capacidade de ingestão. Clinicamente, este período é caracterizado por perda da CC e, por isso, as necessidades nutricionais, principalmente em energia, são elevadas.
2) Gestante e lactante (123 dias): as necessidades nutricionais durante este período são moderadas a altas. Os animais devem manter ou, se possível, aumentar o peso durante este período. O aumento da ingestão de nutrientes neste período melhora a capacidade leiteira do animal, resultando num ganho de peso dos bezerros.
3) Gestante e não lactante (140 dias): as necessidades nutricionais são mais baixas durante este período. As vacas podem ser mantidas com alimentos de baixa qualidade. Este é um excelente momento para aumentar o peso corporal e CC das vacas magras.
4) Pré-parto (50 dias): as necessidades nutricionais aumentam rapidamente durante esta fase. A CC deve ser mantida.

3.2.2.1. Nutrição no pré-parto

As fêmeas bovinas mantidas, antes do parto, com planos nutricionais superiores, têm normalmente, um intervalo mais curto entre o parto e a primeira ovulação, que as sujeitas a planos nutricionais inferiores. A restrição energética durante o período 4 (pré-parto - 50 dias antes do parto) resulta na diminuição da CC ao parto, prolongando o período de APP e diminuindo a percentagem de vacas que irão exibir cio durante a época de reprodução. As taxas de gestação e o intervalo parto-concepção também são afectados pelo nível de energia durante o pré-parto (Anderson & Lewis, n.d.; Lamb & Mercadante, 2015).

3.2.2.2. Nutrição ao Parto

A CC ao parto e o fornecimento de nutrientes durante o período pós-parto afectam o retorno da actividade ovárica cíclica e a taxa de gestação, subsequentes, bem como o intervalo parto-concepção e, por isso, o intervalo entre partos. Segundo DeRouen, Franke & Morrison (1994), citados por Swecker (2015), as vacas com uma CC de 4 e 5 ao parto apresentaram taxas de gestação inferiores, relativamente a vacas com uma CC de 6 e 7 (64,9 e 71,4% vs. 87,0 e 90,7%, respectivamente). Aqueles autores concluíram ainda que vacas com CC superior a 5 tiveram menos 10-18 dias em aberto do que vacas com uma pontuação de 4. Segundo Crowe et al. (2008), a primeira ovulação pós-parto ocorre, em vacas de carne em bom estado corporal, por volta dos 30 dias, depois de três ondas de crescimento folicular. Em vacas com mau estado corporal, a primeira ovulação não ocorre antes dos 70-100 dias após o parto (Swecker, 2015).

3.2.2.3. Nutrição no pós-parto

Uma maior capacidade de ingestão a seguir ao parto pode ter um efeito positivo sobre a duração do anestro nesse período. O intervalo entre o parto e o primeiro cio/ovulação em vacas primíparas foi diminuído com o aumento da ingestão de nutrientes a seguir ao parto (Ciccioli et al., 2003). Segundo Lamb & Mercadante (2015), o aumento da densidade energética da dieta a seguir ao parto promove o aumento do peso corporal e da CC das vacas e diminui o intervalo de tempo entre o parto e o primeiro cio. No entanto, uma correcta suplementação, após o parto, parece ter um efeito mais benéfico em vacas magras (CC ≤4) do que em vacas alimentadas adequadamente (Swecker, 2015). Mesmo com um plano alimentar melhorado após o parto, é necessário ter-se sempre em consideração o impacto negativo do *stress*, causado pela amamentação (por via da inibição da secreção da GnRH por acção dos opióides endógenos, entre eles, as encefalinas, endorfinas e dinorfinas).

São vários os estudos que documentam que o aumento dos níveis nutricionais a seguir ao parto tem um efeito benéfico sobre as taxas de concepção e de gestação de vacas de carne. Segundo Vizcarra et al. (1998), vacas apresentando um SCC entre os 5 e os 6, têm maior probabilidade de evidenciar actividade lútea até ao final da época de reprodução. A melhoria da capacidade de ingestão promove a deposição de gordura, sendo provavelmente este, um pré-requisito para o restabelecimento da função ovárica.

O efeito da pontuação da CC antes, ao parto e depois deste, também tem implicações no peso do vitelo ao nascimento e ao desmame (Lamb & Mercadante, 2015). Um baixo consumo de energia antes do parto resulta em crias menos pesadas ao nascimento e aos 105 dias, por 4,3 e 16,7 kg, respectivamente, em comparação com bezerros de vacas que receberam uma dieta mais energética (Houghton, Lemenager, Horstman, Hendrix & Moss, 1990). Segundo Spitzer, Morrison, Wetteman & Faulkner (1995), citados por Lamb & Mercadante (2015), vitelos de vacas que se apresentaram ao parto com uma CC de 6, revelaram pesos, ao nascimento e ao desmame, superiores ao dos de vacas com uma pontuação de 4. Noutro trabalho, realizado por Ciccioli et al. (2003), bezerros desmamados de vacas alimentadas para ganhar 0,90 kg/d, durante os primeiros 71 dias após o parto, foram 10 kg mais pesados, do que os desmamados de vacas alimentadas para ganhar 0,45 kg/d, durante o mesmo período de tempo.

3.2.2.4. Suplementação proteica, lipídica e mineralo-vitamínica

O efeito da proteína sobre a função reprodutiva é menos claro do que o efeito da energia. Tem sido relatada uma associação entre o aumento da ingestão de proteína, especialmente da proteína degradável no rúmen, e o aumento da taxa de mortalidade embrionária precoce. No entanto, a deficiência de energia ou o desequilíbrio energético e proteico pode ser tão crítico, quanto o excesso de proteína. Segundo Dhuyvetter et al. (1993), a suplementação após o parto, com 50% de proteína não degradável no rúmen, não alterou a taxa de

gestação, em comparação com a de vacas alimentadas com 25% de proteína *bypass* (88 e 86%, respectivamente) (Swecker, 2015).

Em relação aos suplementos lipídicos, estes fornecem uma fonte altamente energética, para além de fornecerem ácidos gordos específicos que influenciam a função reprodutiva. Segundo Williams & Stanko (2000), a suplementação lipídica reforça a função lútea durante o período do pós-parto precoce, reduzindo a incidência de ciclos curtos, impedindo também a queda das concentrações da hormona do crescimento. Níveis mais elevados de gordura na dieta podem também aumentar as concentrações sanguíneas de colesterol, o precursor da P_4 (Swecker, 2015).

As deficiências nutricionais de cobalto, cobre, iodo, manganês, fósforo, selénio, bem como o excesso de molibdénio podem causar infertilidade nos bovinos, por um dos três seguintes mecanismos: (1) diminuição da actividade dos microrganismos do rúmen, com diminuição da digestibilidade; (2) alteração da acção enzimática, que envolve o metabolismo da energia e da proteína ou alteração da síntese de hormonas; ou (3) incapacidade para manter a integridade das células do sistema reprodutor. A deficiência de cobre, selénio e manganês reduz a fertilidade dos animais através de uma alteração na sobrevivência embrionária, retardando também o início da puberdade e da ciclicidade. A deficiência em certos oligoelementos é responsável pela diminuição da imunocompetência, podendo aumentar o risco dos animais sofrerem de infertilidade por causas infecciosas (Swecker, 2015).

3.3. AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM BOVINOS DE CARNE

A fêmea bovina de carne pode armazenar energia sob a forma de gordura quando a ingestão energética excede as suas necessidades nutricionais e, em seguida, pode igualmente, recorrer a essas mesmas reservas e utilizá-las, de forma a suprir as suas necessidades, quando estas últimas excedem os nutrientes fornecidos pela dieta (Rasby, Stalker & Funston, 2007). A percentagem de gordura corporal em determinadas fases do ciclo produtivo das vacas de carne é um importante indicador da capacidade reprodutiva e produtiva da fêmea. A CC, ao contrário do peso vivo, representa uma ferramenta mais fiável de avaliação do estado nutricional de uma vaca (Herd & Sprott, 1986).

A avaliação da CC em vacas de carne é, normalmente, executada através de um sistema de pontuação utilizando-se uma escala de 9 pontos, em que a pontuação 1 é aplicada a animais extremamente magros e a pontuação 9, a animais extremamente obesos (Anderson & Lewis, n.d.; Herd, 1986; Rasby et al., 2007; Swecker, 2015). Esta avaliação, na prática, deve ser realizada varias vezes ao ano, em períodos críticos, como a altura do parto, da reprodução e do desmame (Swecker, 2015).

3.3.1. A pontuação da Condição Corporal

A pontuação ou o "*Score*" da Condição Corporal (SCC) consiste numa avaliação visual e/ou táctil do músculo e do tecido adiposo (Swecker, 2015). Para isso, utilizam-se indicadores visuais ou uma combinação entre esses indicadores e a palpação de determinadas estruturas ósseas. As notas são dadas aos animais de acordo com a quantidade de reservas teciduais, especialmente as de gordura e de músculo, em determinadas regiões do corpo, frequentemente associadas a regiões anatómicas específicas, tais como: costelas, apófises espinhosas e transversas das vértebras, a tuberosidade ilíaca, a base da cauda e o sacro (Machado, Corrêa et al., 2008). O SCC representa um método preciso na determinação das reservas de energia corporal (em forma de gordura) de vacas de carne (Vizcarra et al., 1998).

Uma escala de 9 pontos (1-9) tem sido utilizada com sucesso, desde que foi criada em 1986 por Spitzer. Basicamente, uma vaca com um SCC de 1 representa uma vaca extremamente magra, enquanto uma vaca com um SCC de 9, é extremamente obesa (Anderson & Lewis, n.d.; Anderson, 1998; Rasby et al., 2007). Uma vaca com um SCC de 3 tem aproximadamente 11,3 % de gordura corporal e uma vaca com CC de 6 tem aproximadamente 22,6 % de gordura corporal (Rasby et al., 2007). Existe também uma relação linear entre a mudança do peso corporal e a do SCC, onde a variação (aumento ou diminuição) de uma unidade na escala do SCC está relacionada com uma variação de, aproximadamente, 40 kg de peso vivo (Lamb & Mercadante, 2015).

Tabela 4 - *Score* da Condição Corporal de bovinos de carne (1-9). Adaptado de Machado, Corrêa et al. (2008).

Grupo	SCC	Descrição
MAGRO	1 (Emaciada)	A vaca está extremamente magra, sem nenhuma gordura detectável sobre as apófises vertebrais espinhosas e transversas, nem sobre os ossos da bacia e das costelas. A inserção da cauda e as costelas estão bastante proeminentes.
	2 (Pobre)	A vaca ainda está muito magra, mas a inserção da cauda e as costelas estão menos projectadas. As apófises espinhosas continuam proeminentes, mas nota-se alguma cobertura de tecido sobre a coluna vertebral.
	3 (Magra)	As costelas ainda estão individualmente perceptíveis, mas não tão agudas ao toque. Existe gordura palpável sobre a coluna, sobre a

		inserção da cauda e, alguma cobertura, sobre os ossos da bacia.
LIMITE	4 (Limite)	A individualização das costelas é menos óbvia. As apófises espinhosas podem ser identificadas com o toque, mas percebe-se que estão mais arredondadas. Existe um pouco de gordura sobre as costelas, sobre as apófises transversas e sobre os ossos da bacia.
ÓPTIMO	5 (Moderada)	O animal possui boa aparência geral. A gordura sobre as costelas parece esponjosa à palpação e as áreas nos dois lados da inserção da cauda apresentam gordura palpável.
	6 (Moderada Boa)	É preciso aplicar pressão firme sobre a coluna para se poder sentir as apófises espinhosas. Há bastante gordura palpável sobre as costelas e ao redor da inserção da cauda.
	7 (Boa)	A vaca tem aparência gorda e denota, claramente, grande quantidade de gordura. Sobre as costelas sente-se uma evidente cobertura esponjosa e também ao redor da inserção da cauda. Nota-se alguma gordura ao redor da vulva e das virilhas.
OBESO	8 (Gorda)	A vaca está muito gorda. É quase impossível palpar as apófises espinhosas. O animal possui grandes depósitos de gordura sobre as costelas, na inserção de cauda e abaixo da vulva.
	9 (Extremamente Gorda)	A vaca está nitidamente obesa, com a aparência de um bloco. A estrutura óssea não está muito aparente e é difícil de senti-la. A mobilidade do animal está comprometida pelo excesso de gordura.

3.4. COMO A CONDIÇÃO CORPORAL INTERFERE NA TAXA DE GESTAÇÃO

A nutrição representa o principal factor que afecta a eficiência reprodutiva dos bovinos (Diskin et al., 2003). O tipo de dieta e o tipo de balanço energético a que os animais são sujeitos a seguir ao parto influenciam de forma determinante a função ovárica e folicular

(Lucy, Staples, Michel & Thatcher, 1991). Na base deste processo está uma diminuição na secreção pulsátil de LH pela hipófise, como resultado de uma diminuição da libertação de GnRH pelo hipotálamo (Rhodes, Entwistle & Kinder, 1996). O consumo de energia produz efeitos sobre uma ampla variedade de mecanismos endócrinos, neuronais e metabólicos. Eles incluem alterações: da secreção das hormonas gonadotróficas pela hipófise; da produção de P_4 durante o ciclo éstrico e gestação; da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófisário aos esteróides e à gonadoliberina (GnRH) e mudanças na actividade ovárica, evidenciadas pela secreção de E_2, pelo desenvolvimento folicular e pela ovulação (Short & Adams, 1988).

Nas vacas leiteiras e nas de carne, o BEN e a ingestão reduzida durante o período pós-parto precoce, apesar de não afectarem a população de folículos de pequeno e médio porte, parecem afectar negativamente o tamanho e o destino do folículo ovulatório (Diskin et al., 2003). Num trabalho realizado por Lucy et al. (1991), o balanço energético (definido como a diferença entre a energia limpa ingerida pelo animal e a energia limpa utilizada pelo mesmo) e os tratamentos dietéticos realizados durante o período pós-parto influenciaram o número de folículos em cada classe de tamanho. O número de folículos da classe 1 e 2 (6-9 mm) diminuiu com o aumento positivo do balanço energético, enquanto o número de folículos da classe 3 (10-15 mm) aumentou. Adicionalmente, o diâmetro do maior folículo foi maior em vacas com SCC entre os 5-6 (Castro et al., 2013).

Uma menor ingestão de nutrientes por parte de novilhas cíclicas ou pré-púberes diminui a persistência e o tamanho máximo dos folículos dominantes (Bossis et al., 1999). Vacas sujeitas a uma alimentação mais energética apresentaram ao primeiro cio, uma taxa de gestação superior [91,2% vs. 74,3%, Houghton et al. (1990); 76% vs. 58%, Ciccioli et al. (2003)], assim como um FD maior, ao de vacas sujeitas a uma alimentação menos energética. No entanto, a duração do cio e o número de montas não foram influenciados pela densidade energética da dieta (Ciccioli et al., 2003). Num trabalho realizado por Bossis et al. (1999), novilhas alimentadas para manter o SCC (grupo M) apresentaram folículos ovulatórios 50% superiores aos de novilhas induzidas nutricionalmente ao anestro (alimentadas com uma dieta restrita - grupo R), durante o período correspondente aos dois últimos ciclos éstricos antes das novilhas do grupo R entrarem em anestro. Nas novilhas do grupo M, também a taxa de crescimento dos folículos ovulatórios foi superior, em cerca de 61%. Nas novilhas, nutricionalmente induzidas ao anestro, o aumento do aporte energético da dieta, resultou num aumento gradual da taxa de crescimento do FD, bem como do seu diâmetro máximo, tendo sido este facto, associado a um incremento das concentrações periféricas de IGF-1, LH e E_2 (Diskin et al., 2003). Segundo Rhodes, Entwistle & Kinder (1996), a diminuição da secreção de LH pode ser a causa da redução do tamanho dos folículos dominantes, bem como das concentrações de E_2, durante um período de menor ingestão de energia.

A restrição alimentar aguda e grave tem um efeito imediato, não só na taxa de crescimento e no diâmetro máximo do FD, como também na sua capacidade ovulatória. No entanto, em situações de restrição alimentar crónica (menos grave), a falha na ovulação só ocorre quando as fêmeas perdem uma quantidade significativa de massa corporal (22-24%) (Diskin et al., 2003). A ausência de ovulação, em situações de carência alimentar, é resultado de uma concentração de LH circulante insuficiente para estimular a maturação do folículo ovulatório (Rhodes et al., 1996). Efeitos nutricionais directos sobre a função ovárica parecem actuar por via hepática, promovendo uma redução cumulativa da resposta folicular à LH, interrompendo assim a produção de E_2 pelo folículo. Os efeitos nutricionais indirectos são mediados, aparentemente, pela alteração do gerador de pulsos de GnRH no hipotálamo, reduzindo selectivamente a secreção pulsátil de LH, sem quaisquer efeitos adversos evidentes sobre os padrões de secreção de FSH (Diskin et al., 2003).

A alteração da concentração de determinadas hormonas metabólicas, tais como a GH (hormona do crescimento), a insulina e a IGF-1 (factor de crescimento semelhante à insulina) e de determinados metabolitos do sangue, tais como a glucose e os AGNE (ácidos gordos não-esterificados), são indicadores da disponibilidade de energia e podem fornecer sinais que representam os efeitos da restrição alimentar sobre o eixo hipotálamo-hipofiso-ovárico (Bossis et al., 1999). O SCC ao parto e a nutrição durante o pós-parto influenciam as concentrações sanguíneas da glucose, da insulina e dos AGNE, bem como, o início da actividade lútea, em vacas de carne (Vizcarra et al., 1998). Segundo estes autores, as concentrações de glucose durante a época de reprodução foram superiores em vacas que apresentaram actividade lútea, em comparação com vacas sem actividade lútea (69,9 ± 0,3 e 64,2 ± 0,5 mg/dL, respectivamente).

Nos bovinos de carne, a restrição alimentar suprime a secreção de LH, reduz as concentrações de IGF-1 e de glucose e aumenta a concentração plasmática de GH e de AGNE (Bossis et al., 1999). Num trabalho realizado por Ciccioli et al. (2003), vacas suplementadas a seguir ao parto de forma a ganhar cerca de 0,90 kg/d, ganharam peso corporal e aumentaram o seu SCC, registando também, maiores ($P < 0,05$) concentrações plasmáticas de IGF-1, leptina, insulina, glucose e tiroxina, que as vacas tratadas para se obterem ganhos de 0,45 kg/d. Segundo estes autores, as concentrações daquelas substâncias, embora não sinalizem individualmente o início da função ovárica pós-parto, podem actuar em concertação com outros factores para indicar a adequação da dieta (Ciccioli et al., 2003).

Em suma, a melhoria da capacidade de ingestão, após o parto, estimula a secreção de hormonas anabólicas, que promovendo a deposição de gordura, levam à diminuição do APP e ao aumento da taxa de gestação ao primeiro cio fértil (Ciccioli et al., 2003). Pelo contrário, em situações de anestro de origem alimentar, a deficiente concentração de LH em circulação, é responsável pela ineficaz maturação do folículo em desenvolvimento. A

redução da frequência dos pulsos de LH pode resultar numa diminuição do diâmetro máximo do FD, o que pode culminar na diminuição das concentrações de E_2 e na falha do processo ovulatório (Rhodes et al., 1996; Bossis et al., 1999). O diâmetro do CL tende a ser menor assim como a concentração de P_4 (Rhodes et al., 1996; Bossis et al., 1999).

3.4.1. Hormonas e metabolitos intervenientes

Determinadas hormonas metabólicas, tais como a GH, a insulina, o IGF-1 e a leptina têm papéis essenciais no controlo do desenvolvimento folicular, sendo por isso importantes mediadores dos efeitos da ingestão alimentar e/ou do balanço energético, sobre a fertilidade da vaca (Diskin et al., 2003).

3.4.1.1. Hormona do crescimento (GH)

Os receptores da GH (GH-Rs) podem ser encontrados em muitos tecidos, sendo o fígado o local de maior abundância (Butler et al., 2003). Determinados órgãos e tecidos reprodutivos, tais como hipotálamo, hipófise, CL, folículo ovárico e útero contêm RNAm necessário à síntese de GH-Rs, não estando, ainda hoje, devidamente esclarecido, se todos eles os possuem (Diskin et al., 2003). Segundo Lucy et al. (1999), citados por Diskin et al. (2003) e Flores, Looper, Rorie, Hallford & Rosenkrans (2008), os GH-Rs estão presentes nas células da granulosa, mas a sua abundância é significativamente menor do que a encontrada no tecido lúteo. O mecanismo íntimo de como a GH afecta a função ovárica nos bovinos, não se encontra, por ora, totalmente esclarecido. Nesta espécie, os seus principais efeitos sobre a reprodução parecem ser operados de forma directa, através da ligação aos seus receptores nos folículos, ou indirecta, através do seu mediador de acção biológica, o IGF-1 (Diskin et al., 2003; Flores et al., 2008). Segundo Lucy et al. (1999), citados por Diskin et al. (2003), a GH possui, na esfera reprodutiva, um papel facilitador ao invés de um papel obrigatório, sendo a expressão dos genes responsáveis pela produção de GH-Rs no fígado, muito sensível ao estado nutricional e fisiológico do animal (Butler et al., 2003).

A restrição nutricional aumenta as concentrações sanguíneas de GH (Diskin et al., 2003; Flores et al., 2008). Durante períodos de restrição alimentar e/ou de BEN, o fígado torna-se refractário à GH provocando a desarticulação do eixo GH-IGF, resultando na diminuição das concentrações plasmáticas de IGF-1 e no aumento das concentrações sanguíneas de GH (Butler et al., 2003; Diskin et al., 2003; Flores et al., 2008). A incapacidade da GH em estimular a produção hepática de IGF-1 durante os períodos de BEN é denominada de "resistência à GH" (Butler et al., 2003). O declínio da concentração de IGF-1 tem início duas semanas antes do parto e é acompanhado por uma diminuição da insulina plasmática (Butler et al., 2003). A dinâmica folicular é influenciada pela GH e pelo IGF-1. Vacas tratadas com GH bovina e com fraca CC apresentaram concentrações superiores de IGF-1 em comparação com vacas não tratadas e de baixa CC aos dias 39, 46, 60 e 67 dias pós-parto,

estando a concentração de IGF-1 correlacionada com o diâmetro do maior folículo, um dia após a remoção do CIDR (Flores et al., 2008).

3.4.1.2. Factor de crescimento semelhante à Insulina (IGF-1)

O IGF-1 é produzido principalmente pelo fígado, em resposta à GH, estando esta relação na base estrutural do eixo GH-IGF (Butler et al., 2003). Os locais de acção e os mecanismos exactos pelos quais o IGF-1 afecta a função reprodutiva não são claros (Diskin et al., 2003). No entanto, pressupõem-se que o aumento das concentrações de IGF-1 pode estimular directamente a proliferação e a capacidade esteroidogénica das células da teca e da granulosa, bem como a função da hipófise e do hipotálamo (Diskin et al., 2003). Segundo estes autores, o IGF-1 aumenta o número de locais de ligação da LH nas células da teca, sendo por isso responsável pelo aumento da produção de P_4 e de androstenediona, por essas células. Isto sugere que o IGF-1 tem um papel fundamental no aumento da capacidade de resposta das células foliculares à LH, o que por sua vez, melhoraria a produção de E_2 folicular, um pré-requisito para a ocorrência da ovulação.

Nas fêmeas bovinas, as concentrações sistémicas de IGF-1 são directamente influenciadas pela ingestão de nutrientes (Bossis et al., 2000), pelo SCC (Bishop et al., 1994) e pelo balanço energético (Spicer et al., 1990, citados por Ciccioli et al. 2003). No trabalho realizado por estes últimos autores, as concentrações de IGF-1 no plasma, ao longo das 3 semanas anteriores e as 3 semanas após o final do tratamento nutricional, foram superiores para as vacas do grupo H (alimentadas para ganhar 0,90 kg/d) (29,8 ± 1,7 ng/mL) do que para as do Grupo M (alimentadas para ganhar 0,45 kg/d) (20,2 ± 2,0 ng/mL). Por seu turno, a restrição alimentar promoveu a secreção de GH, ao passo que as concentrações séricas de IGF-1 foram diminuídas, indicando uma insensibilidade do fígado à GH, em animais desnutridos (Bossis et al., 1999; Ciccioli et al., 2003). Segundo Bossis et al. (1999), este facto pode ser resultado de uma diminuição dos GH-R hepáticos (Breier et al., 1988), ou de um desacoplamento do GH-R da sua cascata de resposta intracelular, através de um bloqueio da tradução do RNAm para a síntese de IGF-1 (Thissen et al., 1991). Já Butler et al. (2003) afirmaram que na base do processo poderá estar a regulação negativa do GH-R dependente da insulina. Durante a infusão de insulina, o aumento do IGF-1 foi associado a um aumento no GH-R 1A hepático, um importante GH-R do tecido hepático bovino (Butler et al., 2003).

Baixas concentrações de IGF-1 relacionam-se com um intervalo pós-parto aumentado em vacas de carne e com atrasos no início da puberdade, não existindo, aparentemente, efeitos directos sobre a pulsatilidade da LH (Diskin et al., 2003). Com uma suplementação alimentar adequada, as concentrações de IGF-1 aumentam linearmente até ao reaparecimento da ovulação, mas curiosamente, atingem apenas 50% da concentração inicial, registada antes do início do anestro (Diskin et al., 2003). Nos bovinos, assim como noutras espécies, a

subnutrição, para além de causar uma diminuição nas concentrações circulantes de insulina e de IGF-1, também provoca uma diminuição nas das proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) (Diskin et al., 2003). Estas proteínas aumentam a semivida do IGF em circulação, podendo aumentar ou diminuir a sua biodisponibilidade (Diskin et al., 2003; Flores et al., 2008). Desta forma, reduzidas concentrações de IGFBP no sangue, provocadas pela subnutrição, limitam a disponibilidade de IGF nas células do folículo e, portanto, limitam a sua capacidade de sinergia com as gonadotrofinas da hipófise para estimular a proliferação celular e a esteroidogénese (Diskin et al., 2003). Segundo Flores et al. (2008), a expressão reduzida de RNAm para a produção de IGFBP, em vacas leiteiras magras, altera provavelmente, o recrutamento de folículos necessários para suportar uma função ovárica pós-parto normal.
Nesse mesmo trabalho, o tratamento com somatotropina mostrou-se capaz de aumentar as concentrações de IGF-1 em vacas durante o pós-parto, sendo parcialmente responsável pelo aumento do diâmetro do maior folículo, nas vacas em anestro. As concentrações séricas de IGF-1 foram então correlacionadas positivamente com o diâmetro do maior folículo. Também Bossis et al. (1999) encontraram uma relação positiva entre a concentração de IGF-1 e o diâmetro máximo do folículo ovulatório e do CL.

3.4.1.3. Insulina

A secreção de insulina nos ruminantes resulta da produção de ácidos gordos voláteis (AGV) pelo rúmen, principalmente de ácido propiónico. A maior parte das dietas que aumentam a produção de propionato associam-se a um aumento das concentrações de insulina (Vizcarra et al., 1998). Segundo estes autores, as vacas com maior SCC ao parto apresentaram maiores concentrações de insulina durante a estação de monta. Da mesma forma, a restrição de energia diminuiu as concentrações de insulina em novilhas e vacas (Vizcarra et al., 1998; Bossis et al., 1999; Diskin et al., 2003).
Para além do seu papel no metabolismo dos hidratos de carbono, a insulina também intervém na libertação da LH pela adeno-hipófise, desempenhando assim uma acção na regulação da resposta do ovário às gonadotrofinas (Diskin et al., 2003). Concentrações fisiológicas de insulina são, provavelmente, necessárias para uma esteroidogénese folicular normal, já que, nesta espécie animal, as células da granulosa apresentam receptores para a insulina (Bossis et al., 1999; Diskin et al., 2003). Segundo Diskin et al. (2003), baixas concentrações plasmáticas de insulina podem reduzir a produção de androgénios e de E_2 e, assim, comprometer a capacidade dos folículos em adquirir receptores LH. Num trabalho realizado por Spicer et al. (1994), citados por Bossis et al. (1999), durante um regime de superovulação em bovinos, a perfusão intrafolicular de insulina aumentou as concentrações de E_2 nos folículos, em cerca de 5 vezes.
Para além de todas estas acções, a insulina também parece desempenhar um papel na síntese de GH-R em várias espécies animais. Nos humanos, a diabetes está, por exemplo,

associada a uma resistência à GH, devido a concentrações hepáticas de GH-R reduzidas, sendo isto, provavelmente, resultado de uma insulinopénia (Butler et al., 2003). Esta hormona parece desencadear um sinal metabólico chave no acoplamento do eixo GH-IGF, orquestrando assim uma elevação acentuada nas concentrações de IGF-1, resultado de um aumento paralelo do GH-R 1A e do RNAm do IGF-1, a nível hepático (Butler et al., 2003). Existem dois cenários que podem explicar este aumento do RNAm do IGF-1 a nível hepático: (i) a elevação da insulina provoca um efeito directo sobre a expressão do gene do IGF-1; ou (ii) a elevação da insulina estimula um aumento da expressão do GH-R hepático, permitindo que a GH actue através do seu receptor, aumentando a produção de IGF-1 (Butler et al., 2003).

3.4.1.4. Leptina

A leptina é uma hormona peptídica com um peso molecular de 16 kDa, que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citoquinas. É produzida principalmente pelos adipócitos ou células adiposas, sendo a sua concentração dependente da quantidade de tecido adiposo (Ciccioli et al., 2003). Elevadas concentrações de leptina no plasma suprimem o apetite, sendo por isso considerada uma hormona reguladora do comportamento alimentar (Ciccioli et al., 2003; Diskin et al., 2003).

Para além de regular o comportamento alimentar, a leptina também parece ter um papel importante na regulação da função reprodutiva, desenvolvendo-se actualmente, muita investigação à volta dessa área (Diskin et al., 2003). Os efeitos da leptina sobre a reprodução parecem ser mediados em parte pelo neuropeptídeo Y (NPY) que, por sua vez, parece regular a libertação de gonadotrofinas, por inibição da secreção de LH (Diskin et al., 2003). Determinados tecidos, como o ovário, os testículos, o útero e a hipófise, de ratos e de humanos, possuem RNAm necessário para a síntese do receptor de leptina (Diskin et al., 2003). Segundo estes autores, alterações nutricionais crónicas ou agudas parecem ser capazes de afectar as concentrações sistémicas de leptina, em ovinos e bovinos. Block et al. (2001) mencionaram que, durante o peri-parto, vacas em défice energético evidenciavam uma redução sustentada dos valores de leptina plasmática. Segundo eles, esta redução poderia beneficiar as vacas leiteiras no início da lactação, na medida em que, associado a uma redução dos níveis plasmáticos de leptina estaria um aumento do consumo de ração, bem como o desvio da energia de funções não-vitais, tais como a reprodução. Nesse trabalho, a eliminação do défice de energia no início da lactação associou-se a uma duplicação das concentrações plasmáticas de leptina.

3.4.1.5. Neuropeptídeo Y (NPY)

Alguns peptídeos opióides endógenos, envolvidos na regulação da ingestão alimentar têm sido apresentados como inibidores da libertação da LH durante a fase lútea do ciclo éstrico

de bovinos (Diskin et al., 2003). Alguns deles têm sido implicados na neuro-modulação da libertação de GnRH, em ovelhas. Segundo Gregg et al. (1986) e Whisnant et al. (1986), citados por Diskin et al. (2003), a concentração plasmática de LH encontra-se aumentada após o tratamento de vacas no pós-parto, com um antagonista opióide (naloxona). Assim sendo, os peptídeos opióides endógenos parecem estar envolvidos na supressão da libertação LH, induzida nutricionalmente, durante o pós-parto de vacas de leite e de carne (Diskin et al., 2003). O NPY é um potente inibidor da libertação da LH pela hipófise e, ao contrário da leptina, é um estimulador potente da ingestão alimentar, desempenhando assim um papel importante na regulação da ingestão de alimentos e, por consequência, no balanço energético dos ruminantes (Diskin et al., 2003). É então considerado um neurotransmissor essencial entre o eixo nutricional e o reprodutivo (Diskin et al., 2003).

3.4.1.6. Glucose

Nos ruminantes, a maior parte da glucose disponível para os tecidos é fornecida através da gliconeogénese, porque menos de 10% da glucose total por eles utilizada, é absorvida a partir do intestino (Otchere et al., 1974; Young, 1977). Os hidratos de carbono da dieta são fermentados em AGV no rúmen, sendo o propionato o principal contribuinte para a gliconeogénese (Young, 1977). Para além do propionato, o lactato, o piruvato e a alanina podem também ser reconvertidos em glucose através daquele processo (Vizcarra et al., 1998). A ingestão energética aumentada está, nos bovinos, associada ao incremento das concentrações de glucose no sangue (Vizcarra et al., 1998; Bossis et al., 1999; Diskin et al., 2003). Pelo contrário, a restrição alimentar crónica e a perda de peso corporal, bem como do SCC, estão associados a concentrações de glucose reduzidas (Vizcarra et al., 1998; Bossis et al., 1999).

A concentração de glucose no plasma influencia o desempenho reprodutivo nos bovinos. Vacas com maior SCC ao parto revelaram concentrações de glucose mais elevadas, durante a época de reprodução (Vizcarra et al., 1998). Bucholtz et al. (1996), citados por Diskin et al. (2003), sugeriram que a disponibilidade de glucose afectava a secreção de LH, através da sua acção no seio do sistema nervoso central, aparentemente na área do neurónio periférico de GnRH. Estudos recentes têm demonstrado que a disponibilidade de glucose influencia a secreção de LH, presumivelmente através dos seus efeitos sobre a GnRH (Diskin et al., 2003). Segundo Rutter et al. (1983), citados por Vizcarra et al. (1998), a infusão de propionato, em novilhas, resultou num aumento das concentrações de glucose no sangue, aumentando também a secreção de LH, por estímulo da GnRH. A glucose parece pois, ter um papel central na libertação de LH, reflectindo presumivelmente, o seu papel na modulação da libertação de GnRH (Diskin et al., 2003).

3.4.1.7. Ácidos gordos não-esterificados (AGNE)

Concentrações elevadas de AGNE podem ter uma influência negativa sobre a função ovárica (Bossis et al., 1999). Segundo Grimard et al. (1995) citados por Bossis et al. (1999) e Ciccioli et al. (2003), as concentrações plasmáticas de AGNE foram negativamente correlacionadas com a frequência dos pulsos de LH, durante os primeiros 30 dias pós-parto, em vacas de carne. A restrição alimentar nestes bovinos está associada a um aumento das concentrações de AGNE, como resultado do aumento da lipólise e da liberação de ácidos gordos provenientes dos adipócitos (Bossis et al., 1999; Ciccioli et al., 2003). De acordo com o trabalho de Bossis *et al.* (1999), as concentrações de AGNE são superiores em novilhas com uma dieta restrita, que em novilhas sujeitas a uma dieta de manutenção. Também Ciccioli et al. (2003) registaram concentrações de AGNE superiores em animais alimentados com dietas menos energéticas.

IV. CONTROLO FARMACOLÓGICO DO CICLO ÉSTRICO

4.1. INTRODUÇÃO

Em climas tropicais, a maioria dos rebanhos de bovinos de produção de carne são constituídos por animais *Bos indicus*, devido à sua maior capacidade de adaptação ao clima e a determinadas doenças (p. ex., ectoparasitoses). Apesar desta quase perfeita adaptação, o gado *Bos indicus* apresenta longos períodos de APP, que contribuem para uma eficiência reprodutiva mais baixa quando se compara com a de fêmeas *Bos taurus*. Além disso, a duração do estro neste tipo de fêmeas é inferior ao de raças europeias. Esses dois factores em conjunto (APP mais prolongado e estro de menor duração) conduzem a taxas de detecção de cio mais reduzidas, bem como a taxas de gestação mais baixas, causando um aumento no intervalo parto-concepção, o que leva a perdas económicas consideráveis (Baruselli et al., 2004; Meneghetti et al., 2009). Com o conhecimento dessa situação, surgiu posteriormente a necessidade de se criar diversos protocolos hormonais a fim de se controlar de forma adequada o ciclo éstrico (Kasimanickam, 2015). Essas intervenções hormonais têm sido então utilizadas com o objectivo de aumentar a probabilidade de detecção do cio e de inseminação, de forma a melhorar as taxas de gestação, sob uma variedade de sistemas de gestão (Lucy, McDougall & Nation, 2004). Vários tratamentos foram desenvolvidos recentemente, permitindo a indução da ovulação em vacas em anestro e a IA, sem a necessidade de detecção do cio (Meneghetti et al., 2009).

Os principais objectivos dos programas de sincronização do estro e/ou ovulação são (Lucy et al., 2004): (1) controlar o desenvolvimento da onda folicular; (2) promover a ovulação em vacas em anestro; (3) induzir a regressão do CL em vacas cíclicas; (4) sincronizar o estro e/ou ovulação, no final do tratamento e (5) limitar períodos de observação do cio para a execução das IA em tempo correcto. Os protocolos de manipulação do ciclo éstrico em bovinos podem ser agrupados em dois tipos: os que sincronizam o estro e os que sincronizam a ovulação. Os protocolos de sincronização do estro requerem a detecção do cio, estando por isso o seu sucesso dependente da eficiência na detecção dos mesmos. Os protocolos de sincronização da ovulação permitem a inseminação num momento pré-determinado e prescindem da detecção do cio (Raposo, 2013). O controlo do ciclo éstrico está dependente da manipulação do perfil hormonal, a fim de induzir a ovulação numa altura pré-determinada e conveniente, contrariando a sua ocorrência natural (Ball & Peters, 2004b). Assim sendo, o ciclo éstrico pode ser manipulado de três formas (Ball & Peters, 2004b; Lucy et al., 2004):

- Indução artificial da luteólise, por utilização de um agente luteolítico ($PGF_{2\alpha}$), que só é eficaz quando administrado a vacas cíclicas, com um CL sensível;
- Pelo uso de progestagénios, que criam uma fase lútea “artificial”. Este método também é eficaz para a indução da ovulação, em vacas em anestro;

- Através do uso sequencial de $PGF_{2\alpha}$ e análogos de GnRH, para se obter o desenvolvimento folicular sincronizado após a indução de luteólise.

Para se conseguir um melhor controlo do ciclo éstrico em bovinos, é necessário então, sincronizar a emergência de novas ondas foliculares, garantir uma fase lútea, induzir a luteólise e sincronizar a ovulação (Kasimanickam, 2015). Para tal, utilizam-se hormonas semelhantes às produzidas pela vaca durante um período de ciclicidade normal, sendo estas semelhantes às produzidas no hipotálamo (GnRH), no ovário (E_2 e P_4) e no útero ($PGF_{2\alpha}$) (Lucy et al., 2004).

4.2. EMERGÊNCIA DE NOVA ONDA FOLICULAR

A sincronização do recrutamento/emergência de uma nova onda folicular é o primeiro passo de um protocolo de IATF (Meneghetti et al., 2009). Esta pode ser realizada mecanicamente, por ablação folicular eco-guiada ou farmacologicamente, por indução da ovulação do FD ou por indução da sua atrésia (Bó et al., 2003; Meneghetti et al., 2009). Para isso, pode recorrer-se a um tratamento hormonal com GnRH ou E_2 e P_4, em combinação (Bó et al., 2003).

O processo para controlo da emergência de uma nova onda folicular baseia-se em dois princípios: (1) o surgimento de uma nova onda folicular é principalmente dependente da FSH; e (2) um FD é, em grande parte, dependente da LH. Assim, os efeitos de feedback negativo desencadeados por progestagénios e estrogénios podem ser utilizados para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular por supressão da libertação de FSH e/ou LH. Uma abordagem alternativa, não esteróide, consiste na utilização da GnRH. A administração desta hormona induz a libertação endógena de FSH e LH, causando ovulação ou luteinização de um FD existente, induzindo assim a emergência de uma nova onda (Kasimanickam, 2015). Tratamentos hormonais que modificam os padrões de libertação de FSH e LH afectam claramente o destino de uma onda folicular.

A emergência de uma nova onda folicular com recurso a tratamentos hormonais exógenos requer: (1) bloqueio da onda folicular existente; (2) indução de uma elevação transitória de FSH para o surgimento da nova onda; e (3) o crescimento normal do FD após a selecção (Kasimanickam, 2015). Para se atingir sincronia máxima num programa de sincronização, é necessário dispor no final do tratamento de um FD recentemente seleccionado. Portanto, uma nova onda folicular deve emergir durante o período de tratamento (Diskin et al., 2002). O tempo de início do estro é, segundo Austin, Mihm, Ryan, Williams & Roche (1999) afectado pela duração da dominância do FPO; assim, factores que influenciam esta situação (p. ex., a duração do tratamento de P_4) podem afectar a precisão do início do estro. Segundo Diskin et al. (2002), a sincronia do estro é ideal quando a duração da dominância folicular é inferior a 4 dias ou superior a 10-12 dias. No entanto, esse período de dominância do FPO pode afectar a fertilidade. Quando ele excede os 10 dias, verifica-se um declínio

dramático na taxa de gestação, principalmente devido à presença de oócitos envelhecidos e prematuramente activados (Diskin et al., 2002; Kasimanickam, 2015).

4.2.1. GnRH (Gonadoliberina)

A remoção funcional do FD ou da coorte de folículos em estado de desenvolvimento inicial, por indução de uma ovulação ou luteinização, com recurso à utilização de GnRH exógena, é uma abordagem prática para o início de uma nova onda de crescimento folicular (Kasimanickam, 2015). A sua administração induz um aumento repentino e imediato de FSH e LH, sendo a magnitude deste aumento independente dos dias pós-parto, da concentração de P_4 ou da fase da onda folicular (Diskin et al., 2002; Kasimanickam, 2015). No entanto, o efeito da GnRH sobre a onda folicular existente na altura do tratamento é dependente da presença ou ausência de um FD (Diskin et al., 2002; Lucy et al., 2004; Kasimanickam, 2015b). Num trabalho realizado por Ryan, Mihm & Roche (1998), citados por Diskin et al. (2002), verificou-se que quando a GnRH era administrada após a selecção do FD, causava a ovulação do FD na totalidade das fêmeas, ocorrendo a emergência da nova onda 1,6 ± 0,3 dias mais tarde. Quando ela era administrada antes da selecção do FD, não ocorria qualquer alteração da progressão da onda folicular existente e o FD formava-se, ao fim de 3,6 ± 0,05 dias.

Portanto, a GnRH é capaz de sincronizar o surgimento de uma nova onda folicular apenas quando é administrada na presença de um FD funcional, ao passo que se o for antes da dominância folicular, parece não afectar o progresso da onda, presumivelmente devido à ausência de receptores de LH nas células da granulosa dos folículos em crescimento (Diskin et al., 2002; Kasimanickam, 2015). As ondas foliculares na fase de recrutamento ou na fase inicial de selecção não serão sincronizadas porque o FD não está presente ou é fisiologicamente imaturo (Lucy et al., 2004). Em termos práticos, os animais respondem de forma mais consistente quando a GnRH é administrada entre os dias 5 e 12 do ciclo éstrico (Kasimanickam, 2015). Durante o anestro, a dinâmica folicular das vacas é caracterizada pelo desenvolvimento de várias ondas anovulatórias de crescimento folicular, em que o folículo não alcança a fase final do desenvolvimento, devido à uma frequência inadequada dos pulsos de LH. Desta forma, vacas em anestro e tratadas com GnRH têm uma probabilidade de ovulação mais reduzida que vacas cíclicas submetidas ao mesmo tratamento (Meneghetti et al., 2009). A dose padrão de GnRH (100 µg) foi estabelecida a partir do seu uso inicial no tratamento de quistos foliculares. No entanto, alguns autores têm demonstrado que uma dose mais baixa (50 µg) é igualmente adequada para a sincronização da onda folicular (Lucy et al., 2004).

4.2.2. Estradiol

O E_2 ou um dos seus derivados (benzoato ou cipionato de E_2), quando administrados na dose adequada, podem também, ser utilizados para sincronizar uma onda folicular, nos bovinos (Lucy et al., 2004). A administração do E_2 afecta o FD e a função ovárica a vários níveis; ele suprime a fase de crescimento do FD, sendo essa supressão mais profunda, quando administrado em combinação com P_4 (Kasimanickam, 2015). Na presença de um ambiente com elevada concentração de P_4 (fonte endógena ou exógena), o E_2 reduz a secreção de LH, induzindo a atrésia do FD e causando emergência de uma nova onda folicular. Num ambiente de baixa concentração de P_4, o E_2 irá causar um pico de LH induzido pela libertação de GnRH, que pode levar, em algumas fêmeas, à ovulação ou luteinização do FD (Lucy et al., 2004). Assim sendo, o E_2 pode ter uma acção directa sobre o FD, causando a sua atrésia ou uma acção indirecta, promovendo a ovulação ou a sua luteinização. Para além disso, também provoca regressão lútea quando administrado no início do ciclo éstrico (Lucy et al., 2004). Em alguns protocolos de sincronização, o E_2 é geralmente administrado no início do tratamento, associado à inserção de um dispositivo de libertação de P_4. A administração de 2,5 ou 5 mg de 17β-E_2 (ou 2 mg de benzoato ou de valerato de E_2) a fêmeas com esses dispositivos, em fases aleatórias do ciclo éstrico, foi seguida pelo aparecimento de uma nova onda folicular cerca de 4 dias mais tarde, com pouca variabilidade (Kasimanickam, 2015).

Relativamente à GnRH, alguns autores assumiram que a administração de cipionato de E_2 resultava numa elevação de LH de maior duração, num maior tónus uterino, em mais vacas com cio detectado, numa maior facilidade de inseminação e num custo mais reduzido (Thatcher et al. 2002, citados por Cavalieri, Hepworth, Fitzpatrick, Shephard & Macmillan, 2006). Porém, a administração de estrogénios a bovinos de leite e de carne está proibida na União Europeia desde 14 de Outubro de 2006 (Directiva 2003/74/CE que altera a anterior Directiva 96722/CE). Por força de lei, esta hormona não faz parte dos programas europeus de controlo farmacológico do ciclo éstrico (Lane, Austin & Crowe, 2008).

4.3. CONTROLO DA VIDA ÚTIL DO CORPO LÚTEO

4.3.1. Redução da fase lútea

O segundo passo de um protocolo de sincronização consiste na diminuição das concentrações de P_4, com o início de um pró-estro e o desenvolvimento de um folículo ovulatório. O intervalo de tempo entre o início daquele e a ovulação pode afectar o perfil de secreção da LH, o desenvolvimento folicular e a sua capacidade esteroidogénica, bem como o ambiente uterino (Meneghetti et al., 2009). Em vacas cíclicas, a administração de $PGF_{2\alpha}$ no dia 7 assegura uma elevada taxa de luteólise e provoca uma diminuição nas

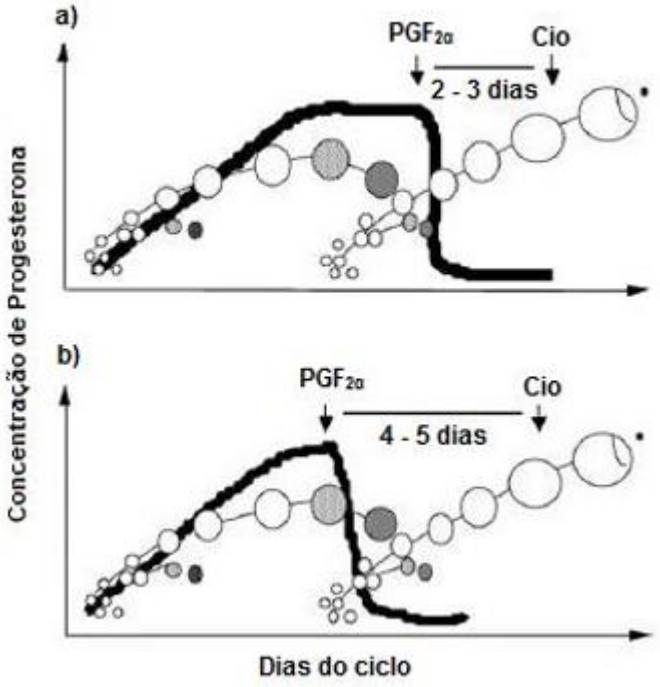
concentrações de P_4 em circulação, numa altura em que o folículo se torna dependente da LH para o seu desenvolvimento (Meneghetti et al., 2009).

4.3.1.1. $PGF_{2\alpha}$

A $PGF_{2\alpha}$ e os seus análogos sintéticos têm sido utilizados para regular o ciclo éstrico em bovinos, há mais de 30 anos (Cavalieri et al., 2006). Esta prostaglandina é uma hormona luteolítica que regula o tempo de vida do CL (Lane et al., 2008). Quando administrada, do dia 6 do ciclo éstrico até ao momento da luteólise natural (dia 17), ela fará com que se dê a regressão imediata do CL, diminuição da secreção de P_4 e transição para a fase folicular, resultando num aumento da frequência dos pulsos de LH, o que permite que ocorra a ovulação (Ball & Peters, 2004b; Lane et al., 2008). Uma das maiores limitações à sua utilização é o facto de ela só actuar em animais que apresentem um CL funcional no momento do tratamento, não sendo, por isso, adequada em novilhas pré-púberes e em vacas no período pós-parto precoce (Lane et al., 2008). A eficácia da $PGF_{2\alpha}$ para induzir o estro está pois, dependente da presença de um CL responsivo. Isso normalmente ocorre durante os dias 5 a 17 (novilhas) e os dias 7 a 17 (vacas) do ciclo éstrico (Cavalieri et al., 2006). Esta ausência de eficácia revelada pela $PGF_{2\alpha}$ durante os primeiros 5/7 dias do ciclo éstrico parece ser devida à insuficiência de seus receptores, num CL imaturo. No entanto, um trabalho realizado por Wiltbank, Shiao, Bergfelt & Ginther (1995), citados por Kasimanickam (2015b), demonstrou a presença precoce de receptores de $PGF_{2\alpha}$ no CL, aos 2 dias após a ovulação. Segundo Wiltbank (1997) citado por Kasimanickam (2015b), o que parece estar na base deste processo é o facto de o CL maduro possuir um ciclo de feedback positivo que resulta na produção de $PGF_{2\alpha}$ intra-luteal que pode continuar o processo de luteólise iniciado pelo tratamento com $PGF_{2\alpha}$.

A $PGF_{2\alpha}$ não afecta directamente a dinâmica das ondas foliculares e, a altura em que se inicia o estro é dependente do *status* folicular no momento da sua administração (Lane et al., 2008) (Figura 7). As fêmeas bovinas com folículos maduros no momento da luteólise entram em cio mais cedo do que as que só têm folículos imaturos (Cavalieri et al., 2006). Se estiver presente um FD funcional no momento da administração da $PGF_{2\alpha}$, as fêmeas entrarão em cio no espaço de 2-3 dias. Porém, se as mesmas se encontrarem numa fase de pré-dominância da onda folicular, será necessário um período adicional de 2 a 4 dias para que um folículo se torne dominante, o que alonga e torna mais variável aquele intervalo de tempo (Baruselli, n.d.; Lucy et al., 2004; Lane et al., 2008). A variação no intervalo de tempo para o estro, após a administração de uma $PGF_{2\alpha}$ pode ser diminuída se as administrações forem feitas em série (intervalo 11-14 dias) ou se a sincronização folicular for pré-estabelecida, 7 dias antes da injecção da $PGF_{2\alpha}$ (Lucy et al., 2004).

Figura 7 - Efeito do estado de desenvolvimento folicular sobre o tempo entre a administração de $PGF_{2\alpha}$ e a exibição do cio, em bovinos. Adaptado de Lane et al. (2008).



Legenda: Em (a) fêmeas que receberam a injecção de $PGF_{2\alpha}$ após a selecção do folículo dominante e em (b) fêmeas que receberam a injecção de $PGF_{2\alpha}$ no momento do surgimento de uma nova onda folicular.

4.3.2. Alongamento/simulação da fase lútea

Neste processo, a função lútea é simulada pela administração de P_4 ou um dos seus derivados (Ball & Peters, 2004b). Os protocolos de sincronização de estro com recurso à P_4 têm vindo a evoluir desde os tratamentos de longa duração, que foram os primeiros a serem usados em bovinos, no controlo do ciclo éstrico. As suas variações incluem diferenças na via de administração, na duração do tratamento, nos métodos para controlar o desenvolvimento do FPO e evitar a persistência do FD e, nas associações terapêuticas pós-P_4, para optimização da sincronização do estro e da ovulação (Cavalieri et al., 2006).

Os métodos de sincronização do estro associados à administração de P_4 resultam numa menor variação do tempo de início do estro em comparação com os que fazem uso exclusivo da $PGF_{2\alpha}$ (Lane et al., 2008). No geral, para todos os tratamentos de sincronização que recorrem à utilização da P_4, uma percentagem elevada (até 85%) de vacas exibem estro, 36-72 horas após a remoção do dispositivo de P_4 (Kasimanickam, 2015).

4.3.2.1. Progesterona (P_4)

A administração de P_4 exógena suprime a frequência dos pulsos de libertação de LH, resultando ou na atrésia ou na persistência do FD, evitando assim a ocorrência de cio e ovulação (Lane et al., 2008). Ela pode ser administrada por via oral, por via intramuscular, por via subcutânea (implantes auriculares) ou através de dispositivos intravaginais. Contudo, em consequência da legislação comunitária, apenas os dispositivos intravaginais são passíveis de serem utilizados em Portugal (Raposo, 2013). Estes variam na forma, desenho e na quantidade de P_4 de que estão impregnados, sendo os mais comuns o PRID (*Progesterone Releasing Intravaginal Device*), PRID Delta e o CIDR (*Controlled Internal Drug Release*), que contêm P_4 para a sincronização do estro e indução da ciclicidade nas vacas (Cavalieri et al., 2006). O PRID, na sua forma original, é um dispositivo em forma de espiral e contém 1,55 g de P_4, enquanto o CIDR é um dispositivo em forma de Y e contém 1,38 g de P_4 (Ball & Peters, 2004b; Kasimanickam, 2015). O PRID Delta, à semelhança do PRID, também possui 1,55 g de P_4, havendo apenas alteração na sua forma e constituição (polietileno e etil vinil acetato). O seu recorte triangular permite distribuir a pressão de forma mais uniforme sobre o trato reprodutor, com dois dos seus lados completamente encostados às paredes internas da vagina, maximizando tanto a superfície de contacto como o conforto do animal. Recentemente surgiu no mercado um outro dispositivo intravaginal de plástico, o Cue-Mate®, que se pode encaixar em cada uma das extremidades do seu eixo em ”Y”, uma matriz de silicone, garantindo-se uma quantidade final de 1,56 g de P_4. Neste modelo, a P_4 é colocada no dispositivo antes de este ser introduzido no animal, apresentando a vantagem adicional de permitir a reutilização da haste após a lavagem e desinfecção (Cavalieri et al., 2006).

Tem sido demonstrado que tratamentos prolongados (18-21 dias) resultam em taxas de gestação baixas, embora a expressão do cio seja elevada (Ball & Peters, 2004b; Lucy et al., 2004; Lane et al., 2008). Este facto deve-se, pelo menos em parte, à ovulação de folículos persistentes que libertam oócitos de baixa competência e, possivelmente também a mudanças adversas no ambiente intra-uterino, que inibem o transporte dos espermatozóides. Alterações estruturais no oócito dentro do FD persistente parecem causar declínio da fertilidade (Lucy et al., 2004). As taxas de concepção após um tratamento prolongado com P_4 são 10-15% inferiores às de vacas tratadas com P_4 durante um período mais curto (Kasimanickam, 2015). Assim, por oposição, tratamentos de curta duração (7-12 dias) resultam, geralmente, em taxas de gestação mais aceitáveis. No entanto e infelizmente, tendem a não controlar o ciclo de forma tão adequada uma vez que, se o tratamento é realizado no início do ciclo, o CL natural pode manter-se para além do período de permanência da fonte progesterónica. Por isso, neste tipo de tratamentos, é sempre necessário incorporar um agente luteolítico, a fim de eliminar qualquer CL natural (Ball & Peters, 2004b).

Os protocolos de sincronização de cio que utilizam progestagénios têm três principais vantagens sobre os protocolos que os não utilizam. Em primeiro lugar, a manutenção da concentração de P_4 no sangue superior a 1 ng/mL inibe a elevação repentina de LH e o comportamento de cio (Lucy et al., 2004; Kasimanickam, 2015b). Para além disso, o recurso à P_4 é, igualmente, um método eficaz para o tratamento do anestro, que afecta cerca de 20% de vacas de carne, no início da estação de reprodução (Kasimanickam, 2015). Assim, a segunda vantagem resulta do facto de vacas em anestro serem sensíveis à P_4, quando ela é utilizada. Numa fêmea em anestro, ela diminui inicialmente a frequência pulsátil da LH; mas, de seguida, verifica-se um aumento desta pulsatilidade, que então promove o desenvolvimento do FD. Para além disso, a P_4 também prepara o centro hipotalâmico para a expressão do cio e para o pico de LH. Desta forma, a remoção da P_4 é seguida por expressão de cio, ovulação e por fim, de uma fase lútea de duração normal, numa grande percentagem de vacas (Lucy et al., 2004; Kasimanickam, 2015b). O tratamento de quistos ováricos representa a terceira vantagem da suplementação com P_4. A sua utilização faz diminuir a frequência pulsátil de LH nas vacas quísticas. Esta diminuição dos pulsos de LH é então seguida da substituição do folículo quístico por uma nova onda folicular. O desenvolvimento de um novo FD é normal e a ovulação ocorrerá após a suspensão da P_4 (Lucy et al., 2004; Kasimanickam, 2015b).

4.4. Indução da Ovulação

A indução da ovulação é o terceiro passo de um protocolo de IATF e pode ser realizada através da utilização de fármacos que visam tal fim, face aos FPO. Ela pode ser obtida utilizando-se hormonas como a gonadotrofina coriónica humana (hCG), a gonadotrofina coriónica equina (eCG) ou ainda, a LH, que actuam directamente sobre os folículos, ou hormonas que induzem um pico pré-ovulatório de LH, tais como a GnRH ou os ésteres de E_2 (Meneghetti et al., 2009).

4.5. Protocolos de Sincronização do Estro

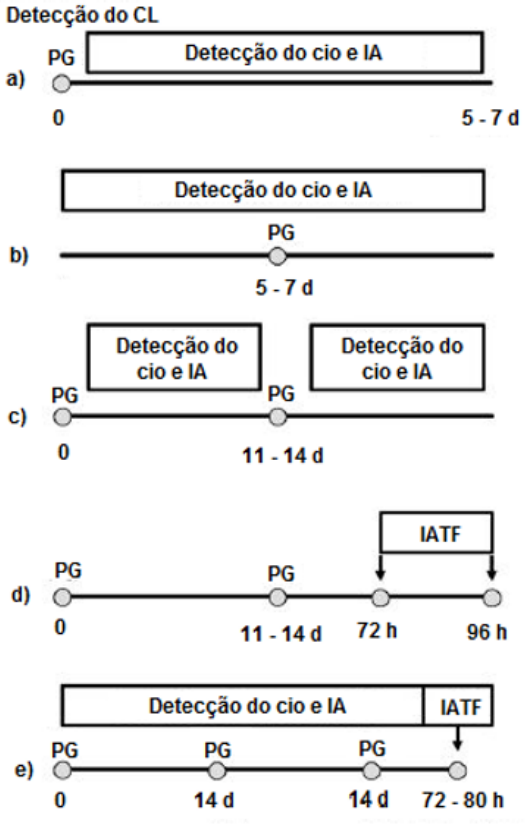
Os protocolos de sincronização do estro requerem a detecção do cio. Embora tendam a apresentar uma maior concentração de fêmeas a evidenciarem cio, o seu sucesso continua dependente da eficiência da detecção de cios na exploração.

A sincronização do estro pode ser alcançada com a utilização isolada de P_4 ou da $PGF_{2\alpha}$. O mecanismo de acção desta última é o de induzir a luteólise, como já foi amplamente referido. A aplicação desta hormona está pois, limitada aos animais que apresentam um CL funcional e maduro. A administração de uma dose luteolítica de $PGF_{2\alpha}$ natural (25 mg) ou dos seus análogos sintéticos (p. ex., 500 µg de cloprostenol) provoca a regressão do CL no diestro, induzindo assim o estro em mais de metade (55-65%) das fêmeas de um rebanho cíclico (Ribeiro, 2015).

Os protocolos de sincronização do estro mais conhecidos, que utilizam $PGF_{2\alpha}$ são (Figura 8):

- "Método dois mais dois" (Figura 8d): todas as vacas recebem uma injecção de $PGF_{2\alpha}$ no primeiro dia de tratamento e uma segunda injecção, 11 a 14 dias mais tarde; em seguida, realizam-se as IA, três e quatro dias mais tarde (72 e 96h, após a segunda administração). Alternativamente, as vacas podem ser inseminadas após observação do cio (Ball & Peters, 2004b);
- "Método um e meio" (Figura 8c): as vacas recebem uma primeira injecção de $PGF_{2\alpha}$ e as que manifestarem cio são inseminadas; as que não apresentarem cio, recebem uma segunda injecção, 11 a 14 dias mais tarde e, podem ser inseminadas em tempo fixo ou após detecção do cio (Ball & Peters, 2004b)
- *Targeted Breeding* (Figura 8e): todas as fêmeas que não forem detectadas em cio após a primeira ou a segunda administração de $PGF_{2\alpha}$, após um intervalo de 14 dias, são tratadas com uma terceira injecção, 14 dias depois, sendo a IA realizada após detecção do cio ou às 72 a 80 h (Ball & Peters, 2004b; Cavalieri et al., 2006).

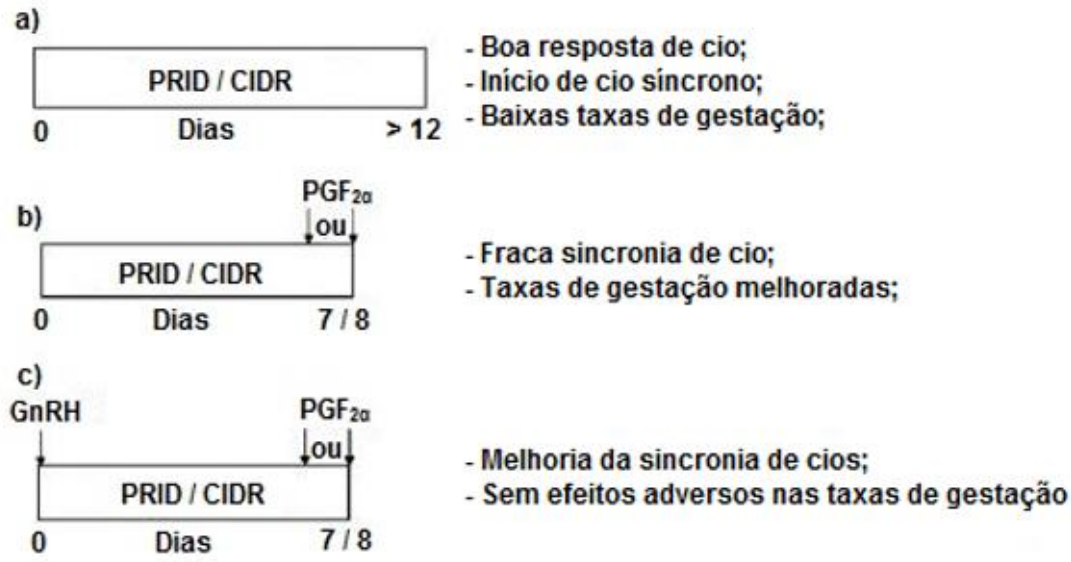
Figura 8 - Representação esquemática de protocolos baseados no uso exclusivo da $PGF_{2\alpha}$, para a sincronização do estro em bovinos. Adaptado de Cavalieri et al. (2006).



Legenda: (a) $PGF_{2\alpha}$ administrada apenas às vacas com um CL e a detecção do estro e IA são realizadas nos 5 a 7 dias seguintes; (b) Detecção do cio e IA realizadas nos primeiros 5 a 7 dias, a $PGF_{2\alpha}$ é depois administrada às vacas que não evidenciaram cio; nova detecção do estro e IA por outros 5 a 7 dias; (c) "Método um e meio"; (d) "Método dois mais dois"; (e) Programa *Targeted Breeding*.

Para além da $PGF_{2\alpha}$, a sincronização do estro pode ser realizada com recurso à utilização da P_4 ou de um progestagénio (Figura 9). Este método de controlo do ciclo éstrico consiste, como também já foi anteriormente referido, em simular a função lútea por via da criação de um "corpo lúteo" artificial. Assim, a libertação das gonadotrofinas é inibida e, com isso, a maturação do folículo ovárico é suprimida até à remoção do bloqueio progesterónico (Ball & Peters, 2004b). O protocolo mais comum consiste na inserção de um dispositivo vaginal (CIDR ou PRID) por 7 dias, associado à administração de $PGF_{2\alpha}$ ao dia 6 ou 7. Este protocolo pode ser melhorado com a administração de GnRH na altura da inserção do CIDR, com o objectivo de favorecer o recrutamento de uma nova onda folicular (Lane et al., 2008).

Figura 9 - Representação esquemática de 3 diferentes protocolos de sincronização do estro utilizando-se a P_4. Adaptado de Lane et al. (2008).



Legenda: (a) Tratamento de P_4 de longa duração (> 12 dias); (b) Tratamento de P_4 de curta duração associado a uma dose de $PGF_{2\alpha}$ no final do tratamento; (c) Tratamento de P_4 de curta duração associado a uma dose de GnRH no início do tratamento e a uma dose de $PGF_{2\alpha}$ no final do tratamento.

4.6. PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

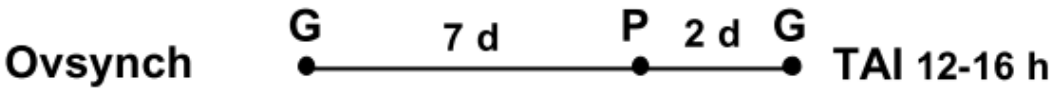
A sincronização da ovulação envolve uma combinação de GnRH e $PGF_{2\alpha}$, com ou sem suplementação de P_4, durante o curso do tratamento. Os protocolos utilizados procuram que a inseminação aconteça num tempo predeterminado (fixo), sem necessidade de detecção de cio. Os protocolos de IATF, que sincronizam o crescimento folicular, a regressão CL, bem como, a ovulação, resultam num desempenho reprodutivo melhorado, porque todos os animais são inseminados, quer apresentem ou não cio (Colazo & Mapletoft, 2014). Vários protocolos têm sido empregues com sucesso e com taxas de gestação aceitáveis.

4.6.1. *Ovsynch*

O protocolo *Ovsynch* foi proposto e apresentado por Pursley e seus colaboradores no ano de 1994 (Lucy et al., 2004). Foi o primeiro protocolo de sincronização desenvolvido que permitiu uma taxa de concepção à IATF aproximada à de uma IA seguida de detecção de cio (Fricke, n.d.).

O *Ovsynch* é um protocolo hormonal que reduz os dias em aberto e aumenta, globalmente, as taxas de gestação, permitindo o controlo da primeira IA e das que lhe poderão seguir (Peters & Pursley, 2003). Envolve a administração de GnRH, numa fase aleatória do ciclo éstrico, seguida de uma injecção de $PGF_{2\alpha}$, 7 dias mais tarde. Uma segunda injecção de GnRH é administrada 48 horas após a injecção da $PGF_{2\alpha}$. O método foi concebido para as IATF serem realizadas cerca de 16 (intervalo 8-24) horas, após a segunda e última injecção de GnRH (Thatcher, Moreira, Pancarci, Bartolome & Santos, 2002; Pursley, 2003; Lucy et al., 2004; Kasimanickam, 2015b) (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo *Ovsynch*. Retirado de Fricke et al (1998).



Legenda: G (GnRH); P ($PGF_{2\alpha}$); TAI (Inseminação Artificial em Tempo Fixo); d (dias); h (horas).

Segundo Fricke et al. (1998), citados por Fricke (n.d.), a primeira injecção de GnRH induz a ovulação em 65% das vacas e provoca surgimento de uma nova onda folicular em 100% destas fêmeas. A administração da $PGF_{2\alpha}$ induz a regressão do CL espontâneo e/ou induzido pela GnRH e, a segunda aplicação de GnRH sincroniza o momento da ovulação do FD, da onda folicular que iniciou o crescimento após a primeira injecção de GnRH. A ovulação de um FD em resposta à segunda GnRH ocorre em 85% das vacas, no período de 24 a 32 horas.

A principal desvantagem do protocolo *Ovsynch* é a baixa taxa de concepção após o tratamento. Este protocolo apenas permite resultados satisfatórios em vacas cíclicas, com uma taxa de gestação global que ronda os 22 a 53%. O sucesso da primeira injecção de GnRH em sincronizar o crescimento folicular é muito bom nas vacas, mas não tanto nas novilhas (Kasimanickam, 2015), pois está dependente da presença de um FD. Melhorar a sua taxa de concepção aumentaria muito a utilização deste método. Dessa forma, não deve ser utilizado em novilhas ou em vacas acíclicas, uma vez que reduz ainda mais, as taxas de concepção.

A eficiência da sincronização do cio e da ovulação em protocolos baseados na administração de GnRH-$PGF_{2\alpha}$ depende do estádio de desenvolvimento folicular no

momento da primeira injecção de GnRH (Ribeiro, 2015). Segundo Vasconcelos, Silcox, Rosa, Pursley & Wiltbank (1999), melhores resultados de fecundação são obtidos quando se inicia o *Ovsynch* algures entre o 5º e o 12º dia do ciclo éstrico, sendo a taxa de fertilidade mais elevada quando as vacas ovulam em resposta à primeira GnRH. As principais causas do insucesso de sincronização quando este protocolo de Ovsynch é iniciado em outras fases do ciclo éstrico são: (1) ausência de resposta ovulatória à primeira dose de GnRH; (2) atrésia do FD antes da administração da $PGF_{2\alpha}$; e (3) luteólise espontânea entre a administração da primeira dose de GnRH e a da $PGF_{2\alpha}$ (Pursley & Bello, 2007).

São várias as fases do ciclo éstrico, quando o protocolo *Ovsynch* é iniciado, que podem levar a taxas de gestação reduzidas. O início do protocolo entre os dias 13 e 17 do ciclo, momento em que a regressão espontânea do CL ocorre, é um destes exemplos. Neste caso, a regressão lútea terá início antes da administração da $PGF_{2\alpha}$. Assim, a ovulação irá ocorrer antes do momento da IA, havendo poucas possibilidades da vaca ficar gestante. Outra fase que confere menor probabilidade de concepção ao protocolo *Ovsynch* é a fase inicial do ciclo (entre os dias 2-4), altura em que o FD recrutado não está suficientemente desenvolvido para puder ovular em resposta à primeira GnRH. Como consequência, o FD na altura da segunda injecção de GnRH está envelhecido, pois expressou a sua dominância durante 5 dias ou mais. Estes folículos que têm períodos de dominância superior a 5 dias possuem oócitos menos competentes e alguns deles, não ovulam em resposta à administração da GnRH (Thatcher et al., 2002). Estes factos indicam que uma pré-sincronização, antes da implementação do programa *Ovsynch*, poderá melhorar as taxas de gestação, uma vez que as vacas entrariam para o programa *Ovsynch*, no período mais favorável do ciclo éstrico (ou seja, entre os dias 5-12) (Thatcher et al., 2002).

Os diferentes estádios de desenvolvimento do FD no momento da administração da segunda GnRH, causados por um possível desajuste da sincronia folicular, criam resultados improdutivos dentro deste sistema de sincronização (Lucy et al., 2004). Por exemplo, uma elevada incidência de perdas embrionárias após a IA, foi demonstrada em vacas que ovularam folículos pequenos, em resposta ao *Ovsynch* (Lucy et al., 2004). Segundo estes autores, a ovulação de pequenos FD pode levar ao desenvolvimento de CLs de menores dimensões, a uma menor concentração de P_4 no sangue e/ou a ciclo éstricos de curta duração.

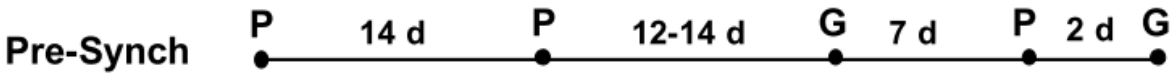
4.6.2. Modificações do *Ovsynch*

O protocolo *Ovsynch* foi modificado numa variedade de formas a partir do seu modelo original. Essas modificações destinaram-se a diminuir o número de manipulações por fêmea ou a melhorar a resposta global ao programa (Lucy, 2007).

4.6.2.1. Pré-sincronização (Protocolo *Pre-Synch*)

A pré-sincronização consiste numa modificação do protocolo *Ovsynch*, em que duas injecções de $PGF_{2\alpha}$ são administradas com 14 dias de intervalo, ocorrendo a última, 12 a 14 dias antes da primeira injecção de GnRH do protocolo *Ovsynch* (Figura 11). Esta fórmula melhora a taxa de concepção ao primeiro serviço (em cerca de 10%) em comparação com *Ovsynch* clássico, constituindo uma boa estratégia para a primeira inseminação pós-parto (Fricke, n.d.; Cavalieri et al., 2006).

Figura 11 - Representação esquemática do protocolo *Pre-Synch*. Retirado de Fricke, n.d.



Legenda: G (GnRH); P ($PGF_{2\alpha}$); d (dias).

O objectivo principal desta metodologia é fazer com que a maioria das vacas esteja entre os dias 5 e 12 do ciclo éstrico, quando se realiza a primeira administração de GnRH do protocolo *Ovsynch*. Desta forma, eleva-se a probabilidade de ovulação a essa primeira intervenção e garante-se uma luteólise e ovulação sincronizada com a administração da $PGF_{2\alpha}$ e da GnRH, respectivamente (Cavalieri et al., 2006).

Para além deste, existe outro protocolo de pré-sincronização que pode ser aplicado antes de um *Ovsynch*. Este protocolo, designado por G6G, começa com uma injecção de $PGF_{2\alpha}$ (indução da luteólise do CL funcional), à qual se segue uma aplicação de GnRH (indução da ovulação), 2 dias mais tarde. O *Ovsynch* está programado para começar 6 dias após essa administração de GnRH. Assim, garante-se que a vaca esteja no dia 6 de um novo ciclo éstrico, apresentando um FD funcional, capaz de ovular, em resposta à primeira GnRH do *Ovsynch* (Kasimanickam, 2015).

A pré-sincronização com P_4 também é possível. Segundo Small, Colazo, Kastelic & Mapletoft (2009), a pré-sincronização com P_4 durante 7 dias (mais $PGF_{2\alpha}$ no dia da inserção do implante) ou 15 dias (sem $PGF_{2\alpha}$) aumentou a proporção de vacas que ovularam ao primeiro tratamento com GnRH (77% versus 55%; 75% versus 49%, respectivamente). No entanto, o efeito da pré-sincronização sobre a taxa de gestação foi influenciada pelo número de partos. A pré-sincronização com P_4 durante 7 dias, asssociada à $PGF_{2\alpha}$ melhorou a taxa de gestação de 40% para 64% ($p<0,01$) em vacas primíparas, mas não afectou a taxa de gestação das multíparas.

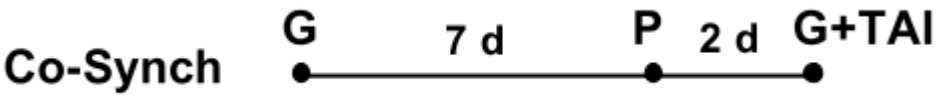
A pré-sincronização com 2 injecções de $PGF_{2\alpha}$ melhorou a taxa de gestação de vacas leiteiras, mas não em novilhas de carne. Por seu turno, a pré-sincronização com P_4 melhorou a taxa de gestação de vacas de carne a amamentar (Colazo & Mapletoft, 2014).

4.6.2.2. Co-sincronização (Protocolo *Co-Synch*)

O protocolo *Co-Synch* representa uma forma específica do *Ovsynch* em que a IATF ocorre no momento administração da segunda dose de GnRH (Fricke, n.d.; Kasimanickam, 2015b) (Figura 12). Esta estratégia revela uma enorme vantagem porque, com ela, elimina-se uma manipulação da fêmea, quando se compara com o *Ovsynch* clássico (Kasimanickam, 2015). No entanto, tem revelado uma taxa de concepção inferior em relação a este último (Fricke, n.d.).

A utilização deste protocolo não deve ser recomendada em explorações modelo, com boa detecção de cio e elevada taxa de submissão, uma vez que a taxa de concepção, após IATF, tende a ser baixa (Lane et al., 2008).

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo *Co-Synch*. Retirado de Fricke, n.d.



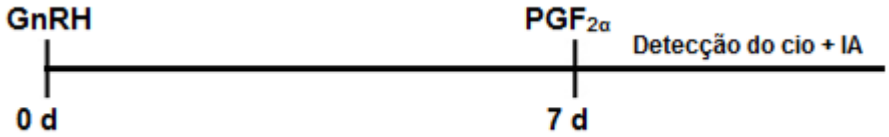
Legenda: G (GnRH); P ($PGF_{2\alpha}$); TAI (Inseminação Artificial em Tempo Fixo); d (dias).

4.6.2.3. Sincronização selectiva (Protocolo *Select-Synch*)

O protocolo *Select-Synch* representa também uma modificação do protocolo *Ovsynch*, em que a administração de GnRH é seguida, 7 dias mais tarde, pela administração de uma dose luteolítica de $PGF_{2\alpha}$, com IA a ocorrer após a detecção do cio (Figura 13).

Para além de ser um método simples, com redução do número de manipulações por animal, é também um método económico. Há diminuição dos custos hormonais, uma vez que há menos uma administração de GnRH.

Figura 13 - Representação esquemática do protocolo *Select-Synch*. Adaptado de Raposo (2013).

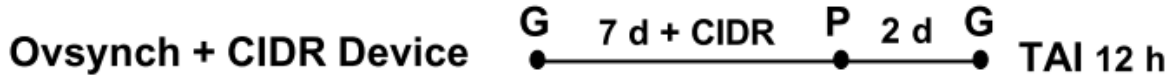


Legenda: d (dias); IA (Inseminação Artificial).

4.6.2.4. Protocolo *Ovsynch* associado à progesterona (*Ovsynch* + CIDR)

Muitos trabalhos têm investigado a associação de P_4 ao protocolo *Ovsynch*. Para este fim, um dispositivo intravaginal (CIDR ou PRID) é inserido na fêmea, em simultâneo com a primeira injecção de GnRH do protocolo *Ovsynch* e é mantido no local, geralmente por 7 dias, sendo então administrada a $PGF_{2\alpha}$ (Lane et al., 2008; Kasimanickam, 2015b) (Figura 14).

Figura 14 - Representação esquemática do protocolo *Ovsynch* + CIDR. Retirado de Fricke, n.d.

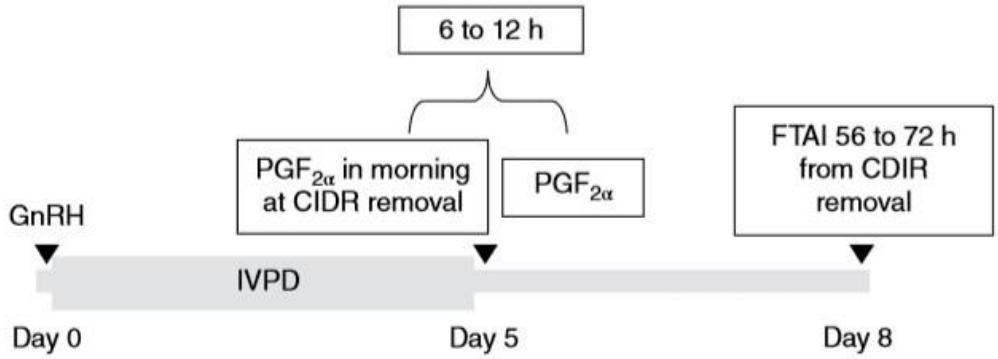


Legenda: G (GnRH); P ($PGF_{2\alpha}$); CIDR (*Controlled Internal Drug Release*); TAI (Inseminação Artificial em Tempo Fixo); d (dias); h (horas).

Com a adição da P_4 ao protocolo *Ovsynch*, registou-se uma melhoria na sincronia da ocorrência do estro e da ovulação, bem como um aumento na taxa de concepção em vacas e novilhas. Para além disso, é vantajoso utilizar estes protocolos em vacas em anestro e em novilhas e vacas com quistos ováricos (Kasimanickam, 2015).

Recentemente foi testada uma modificação desta técnica, em associação ao protocolo *Co-Synch*. O objectivo foi o de encurtar o tratamento com P_4 por alguns dias, de forma a alongar a fase de pró-estro (intervalo entre a $PGF_{2\alpha}$ e a segunda GnRH) para as 72 horas (Kasimanickam, 2015). Desta forma, o folículo ovulatório beneficia do apoio de uma taxa adicional de gonadotrofina, pois deixa de estar sobre o efeito inibitório da P_4, possuindo assim um período de crescimento e desenvolvimento, superior (Colazo & Mapletoft, 2014). Para isso, promove-se uma suplementação de P_4, de apenas 5 dias, entre a primeira GnRH e a $PGF_{2\alpha}$. No entanto, devido a esse intervalo de tempo mais curto, tornam-se necessárias duas administrações de $PGF_{2\alpha}$, com 6 a 8 horas de intervalo, para se conseguir induzir a regressão completa do CL, resultante da primeira GnRH (Colazo & Mapletoft, 2014) (Figura 15). Esta abordagem melhorou a taxa de gestação, em vacas de carne, em cerca de 15% (Kasimanickam, 2015).

Figura 15 - Representação esquemática do protocolo *Co-Synch* + 5d CIDR. Retirado de Kasimanickam (2015b).



Legenda: IVPD (Dispositivo Intravaginal de Progesterona); CIDR (*Controlled Internal Drug Release);* FTAI (Inseminação Artificial em Tempo Fixo).

4.6.2.5. Protocolo *Heat-Synch*

O protocolo *Heat-Synch* representa uma outra modificação do protocolo *Ovsynch*, em que 1 mg de cipionato de E_2 (ECP) é administrado (para induzir a ovulação), 24 horas após a injecção de $PGF_{2\alpha}$, em substituição da administração original de GnRH, 48 horas após a administração do agente luteolítico. A IATF tem então lugar 48 horas após a injecção de ECP (Fricke, n.d.) (Figura 16). A administração de um estrogénio na presença de um folículo com capacidade ovulatória e, na ausência de P_4, faz com que se ocorra a ovulação por estimulação da libertação de GnRH hipotalámica que, por sua vez, provoca um aumento na libertação de LH pela adeno-hipófise (Fricke, n.d.).

A taxa de gestação foi ligeiramente inferior nos animais submetidos ao protocolo *Heat-Synch* (35,1 ± 5,0%) em comparação com animais sujeitos ao *Presync-Ovsynch* (37,1 ± 5,8%) (Thatcher et al., 2002).

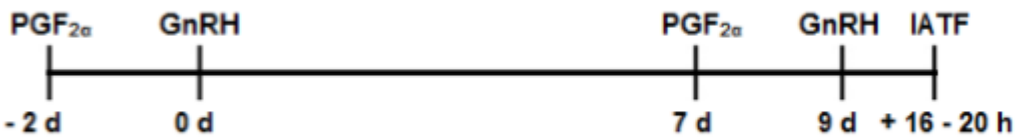
Figura 16 - Representação esquemática do protocolo *Heat-Synch*. Retirado de Fricke, n.d.

Legenda: G (GnRH); P ($PGF_{2\alpha}$); ECP (Cipionato de Estradiol); d (dias).

4.6.2.6. Protocolo *Double-Synch*

O protocolo *Double-Synch* foi desenvolvido por Cirit, Ak & Ileri (2007) e, constitui uma das mais recentes modificações do protocolo *Ovsynch*. Envolve uma administração adicional de $PGF_{2\alpha}$, dois dias antes de se iniciar o protocolo *Ovsynch*, com IA em tempo fixo entre as 16-20 h após a última administração de GnRH (Öztürk, Cirit, Baran & Ak, 2010) (Figura 17). Representa pois, uma forma bastante rápida de pré-sincronizar o protocolo *Ovsynch*.

Figura 17 - Representação esquemática do protocolo *Double-Synch*. Adaptado de Raposo (2013).



Legenda: d (dias); h (horas); IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo).

4.7. MANIPULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS *BOS INDICUS*

Vários tratamentos têm sido recentemente desenvolvidos para permitir a indução da ovulação em vacas em anestro e a IA, sem necessidade de detecção do cio (Meneghetti et al., 2009). Protocolos de IATF são hoje, amplamente utilizados devido à sua capacidade de aumentar o número de fêmeas inseminadas sem a necessidade da detecção do cio (Sá Filho et al., 2011). Não menos importante, são os protocolos que reduzem o número de passagens das fêmeas à manga e, com isso, o stress, principalmente em animais mais temperamentais como é o caso dos *Bos indicus*, para os quais o stress é um factor que afecta negativamente a secreção da LH.

As hormonas utilizadas nesses protocolos são os progestagénios, a $PGF_{2\alpha}$ ou seus análogos, e o E_2. Para além disso, a inclusão da gonadotrofina coriónica equina (eCG), como indutor do crescimento folicular, tem melhorado a eficácia dos protocolos de IATF, aumentando a resposta ovulatória e a taxa de gestação no gado *Bos indicus* (Sá Filho et al., 2010; Nogueira et al., 2014).

O tratamento com a $PGF_{2\alpha}$ tem sido o mais comumente utilizado para sincronização do ciclo éstrico em bovinos. Nas fêmeas *Bos indicus*, mesmo quando a presença de um CL é confirmada na altura do tratamento, a resposta de cio foi cerca de 30% inferior àquela que é relatada para as fêmeas *Bos taurus*. A combinação desta baixa resposta ao tratamento com $PGF_{2\alpha}$, com uma elevada incidência de anestro nas fêmeas que são criadas em climas tropicais, explica a grande variabilidade encontrada nas taxas de resposta ao cio e nas taxas de gestação, após tratamentos com recurso exclusivo à $PGF_{2\alpha}$. Estes resultados salientam a necessidade de se encontrarem metodologias que controlem, de forma adequada, os desenvolvimentos folicular e lúteo, de forma a serem obtidas elevadas taxas de gestação à IATF, dispensando-se a detecção do cio (Bó et al., 2003).

O desenvolvimento de uma nova onda folicular em bovinos *Bos indicus* pode ser controlado, mecanicamente, por ablação folicular eco-guiada ou hormonalmente, através de tratamentos com GnRH ou E_2, em combinação ou não, com a P_4 (Bó et al., 2003). Segundo Baruselli et al. (2004a), Maraña et al. (2006) e Meneghetti et al. (2009), citados por Sá Filho et al. (2010), os programas de IATF que utilizam ésteres de E_2 associados a dispositivos intravaginais (CIDR ou PRID) ou implantes auriculares de P_4 (Norgestomet), originam taxas de gestação satisfatórias (cerca de 50%) em vacas *Bos indicus* em amamentação.

No entanto, existe a necessidade de se proceder a alguns ajustes em determinados protocolos de IATF a serem utilizados em novilhas Nelore (Cipriano, Carvalho, Marangoni & Nogueira, 2011).

Segundo Marques et al. (2005), verificaram-se quebras na taxa de gestação quando novilhas Nelore foram sujeitas a um protocolo que consistia na inserção de um dispositivo de P_4 (1,9 g), associada à uma injecção de E_2 (Cipriano et al., 2011). Tem sido sugerido que concentrações elevadas de P_4 durante o protocolo de IATF fazem reduzir a frequência dos

pulsos de LH, facto que diminui o desenvolvimento e o diâmetro do FD e compromete a fertilidade (Martins et al., 2014). Quando menores quantidades de P_4 exógena foram administradas, verificou-se uma melhoria da taxa de ovulação, de concepção e de gestação (Peres et al., 2009; Martins et al., 2014). O mecanismo que está na base destes resultados parece estar relacionado com os efeitos negativos da P_4 sobre o desenvolvimento folicular, devido a uma redução da frequência dos pulsos de LH (Peres et al., 2009).

As alternativas que visam aumentar o suporte gonadotrófico dos folículos durante o protocolo de IATF parecem ser importantes, uma vez que melhoram a fertilidade. Estas alternativas incluem, a redução da concentração de P_4 através do recurso a um dispositivo (CIDR) reutilizado ou à estimulação da libertação de gonadotrofinas endógenas, através do tratamento com $PGF_{2\alpha}$, 2 dias antes da remoção do dispositivo intravaginal ou ainda, à administração exógena de gonadotrofinas (Martins et al., 2014).

Para além da quantidade de P_4 que impregna o dispositivo intravaginal, também o tipo de dispositivo utilizado parece ter alguma influência no êxito do protocolo de IATF. Segundo Carvalho et al*.* (2008), as novilhas Bos *indicus* não respondem de forma tão eficaz a um dispositivo intravaginal de P_4 em comparação com novilhas *Bos taurus* ou novilhas cruzadas. Segundo Sá Filho et al. (2005a), citados em Sá Filho et al. (2010), a taxa de crescimento do FD foi mais rápida em novilhas tratadas com implantes auriculares de P_4 do que aquelas tratadas com dispositivos intravaginais de P_4, resultando num maior tamanho do folículo ovulatório e em melhor taxa de ovulação.

O E_2 ou um dos seus ésteres (p. ex., o valerato de E_2) têm sido utilizados com grande sucesso na sincronização da emergência da onda folicular em bovinos (Bó et al., 2002). A associação entre o E_2 e a P_4 em bovinos induz a regressão folicular, promovendo subsequentemente, a emergência de uma nova onda folicular, de forma síncrona (Sá Filho et al., 2011).

Nos bovinos *Bos taurus*, o valerato de E_2 (VE), com um tempo de semivida mais longo que o BE ou o 17β-E_2, parece ser responsável por uma supressão mais intensa da FSH (Martínez, Kastelic, Bó, Caccia & Mapletoft, 2005). O tratamento com 5 mg de VE parece resultar num maior intervalo entre o tratamento e a emergência da nova onda folicular, bem como uma menor sincronia na emergência da nova onda, quando comparado com um tratamento com uma dose de apenas 2 mg (Sá Filho et al., 2011). Conclui-se portanto, que o intervalo entre o tratamento e a emergência folicular é dependente, tanto do éster de E_2 utilizado, como da dose administrada.

No trabalho realizado por Sá Filho et al. (2011), em bovinos *Bos indicus,* o tratamento com VE (5 ou 2,5 mg) resultou num intervalo maior e mais variável entre o tratamento e a emergência folicular do que o tratamento com BE. Vacas tratadas com 5 mg de VE apresentaram um intervalo mais longo (4,0 ± 0,5 dias) do que vacas tratadas com BE (2,5 ±

0,2 dias). No entanto, registou-se um intervalo intermédio nas fêmeas tratadas com 2,5 mg de VE (3,1 ± 0,4 dias).

Para além do BE, utilizado com grande sucesso em muitos protocolos de IATF para indução da ovulação, o cipionato de E_2 (CE) tem também sido utilizado, rotineiramente, em muitos destes protocolos, à base de P_4, para sincronizar o tempo de ovulação em vacas *Bos indicus* aleitantes (Sá Filho et al., 2011). O seu baixo custo e o tempo de administração conveniente (em simultâneo com a remoção do dispositivo de P_4), reduz o número de manipulações dos animais, sem afectar a sua eficiência global (Sá Filho et al., 2011).

O CE apresenta uma baixa solubilidade na água, característica que faz com que a sua absorção a partir do local da injecção seja retardada. Estudos anteriores (Martins et al., 2005; Souza et al., 2009, citados por Sá Filho et al., 2011) demonstraram que o tratamento com CE, na altura da remoção do dispositivo intravaginal de P_4, é menos eficaz para sincronizar a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH e da ovulação, que a utilização da GnRH ou do BE. No entanto, segundo Martins et al. (2014), a utilização de CE no momento da remoção do CIDR melhorou a proporção de novilhas que manifestaram cio, relativamente à utilização de GnRH às 54 (G54) e 72 (G72) horas após a remoção do CIDR (CE: 40,9%; G54: 17,1%; e G72: 32,0%).

De acordo com Sá Filho et al. (2010), o tratamento com GnRH no momento da IA durante o protocolo de IATF à base de P_4, em vacas aleitantes *Bos indicus*, impediu a ocorrência de ovulações retardadas, melhorando a sua sincronia e a taxa de gestação por IATF.

Num outro trabalho realizado por Sá Filho et al. (2011), a taxa de gestação por IA em bovinos *Bos indicus* foi semelhante para os três indutores de ovulação (BE = 40,6%; CE = 48,3%, ou GnRH = 48,7%).

A altura da administração da $PGF_{2\alpha}$ durante o protocolo de IATF também parece condicionar o resultado final (Meneghetti et al., 2009). Segundo Peres et al. (2009), as fêmeas (novilhas e vacas *Bos indicus*) que receberam $PGF_{2\alpha}$ no dia 7 do protocolo, apresentaram menores concentrações de P_4 no soro ao dia 9 (3,05 ng/mL vs. 4,58 ng/mL), um folículo maior à IA (11,54 mm vs. 10,84 mm) e, melhores taxas de ovulação (85,4% vs. 77,0%), de concepção (60,9% vs. 47,2%) e de gestação (52,0% vs. 36,4%), que outras em que a $PGF_{2\alpha}$ foi administrada ao dia 9. As baixas concentrações de P_4, ao dia 9, fazem aumentar a pulsatilidade da LH resultando em maior diâmetro do folículo e melhores taxas de ovulação, de concepção e de gestação. Com este trabalho, estes autores concluíram que a administração de $PGF_{2\alpha}$ no início do protocolo, em vacas não lactantes, permitiu melhorar a sua fertilidade em resposta ao protocolo de IATF com base em P_4 e E_2. Segundo Carvalho et al. (2008), o efeito positivo da antecipação da administração de $PGF_{2\alpha}$ pode ser mais evidente em bovinos *Bos indicus* do que no gado *Bos taurus*, uma vez que os primeiros mantêm maiores concentrações circulantes de P_4 em resposta ao tratamento com CIDR.

Num trabalho realizado por Meneghetti et al. (2009), foram obtidas taxas de gestação satisfatórias (40% a 55%) em bovinos *Bos indicus* no pós-parto com o seguinte protocolo: Dia 0: inserção do CIDR associada à administração de 2,0 mg BE (i.m.); Dia 9: remoção do CIDR e administração de 12,5 mg $PGF_{2\alpha}$ (i.m.), juntamente com 0,5 mg de CE (i.m.), em associação com desmame temporário; Dia 11: realização da IATF e a reunião dos vitelos. Nas vacas cíclicas, a antecipação do tratamento com $PGF_{2\alpha}$ para o dia 7, melhorou a taxa de gestação.

A adição da eCG, no momento da remoção do dispositivo de P_4, pode ser útil para melhorar o desempenho reprodutivo de bovinos de carne criados em climas tropicais. A sua utilização promoveu o aumento das concentrações de P_4 no plasma e melhorou as taxas de gestação em vacas *Bos indicus* aleitantes (Baruselli et al., 2004; Peres et al., 2009; Nogueira et al., 2014). No entanto, é importante mencionar que a eficácia da eCG varia de acordo com o SCC, o número de dias pós-parto e a associação de outras estratégias de maneio, como o desmame temporário (Binelli, Machado, Bergamaschi & Bertan, 2009).

No trabalho realizado por Sá Filho et al. (2010), a adição de eCG ao protocolo de IATF (Norgestomet + BE) fez aumentar o diâmetro do maior folículo (MF) no dia da IATF (10,6 ± 0,2 mm vs. 9,5 ± 0.2 mm), a taxa de crescimento final do MF (1,14 ± 0.1 mm/dia vs. 0,64 ± 0.1 mm/dia), a taxa de ovulação (94,4% vs. 73,6%), o diâmetro do CL ao dia 15 após a IATF (15,5 ± 0,3 mm vs. 13,8 ± 0,3 mm), as concentrações séricas de P_4, 5 dias após a IATF (6,6 ± 1,0 ng/mL vs. 3,6 ± 0,7 ng/ml), bem como, a taxa de gestação (50,0% vs. 36,8%).

De acordo com os mesmos autores, a eCG representa uma ferramenta importante para o reforço do crescimento folicular, da ovulação, do tamanho e da função do CL e das taxas de gestação, em protocolos de IATF à base de P_4, em novilhas *Bos indicus*.

Os tratamentos com GnRH/$PGF_{2\alpha}$/GnRH (*Ovsynch*) têm apresentado resultados inconsistentes, provavelmente devido ao número variável de vacas em anestro (Baruselli et al., 2004). Já com vacas cíclicas, estes protocolos parecem resultar em taxas de gestação aceitáveis (Bó et al., 2003).

O controlo exógeno dos desenvolvimentos folicular e lúteo facilita pois, a aplicação de tecnologias de reprodução assistida em fêmeas bovinas *Bos indicus*, oferecendo a possibilidade de planear programas de IA, sem a necessidade de detecção de cio (Bó et al., 2003).

V. TRABALHO EXPERIMENTAL

5.1. INTRODUÇÃO

Apesar de ser um assunto amplamente estudado, o sucesso de um protocolo de IATF ainda apresenta elevada variabilidade (Baruselli et al., 2004). As diferentes TG obtidas podem estar associadas, entre outros factores, à fase do ciclo éstrico em que o tratamento é iniciado (Meneghetti et al., 2009), à resposta individual apresentada pelos animais ao tratamento e também ao diâmetro do FPO no momento da IATF (Pfeifer et al., 2012). Um aumento da taxa de concepção pode associar-se à elevação das concentrações pré-ovulatórias de E_2 ainda antes da IATF, à duração do pró-estro (Bridges et al., 2008; Bridges, Mussard, Burke & Day, 2010) ou ainda à administração exógena de E_2 (p. ex. cipionato de estradiol [CE] ou benzoato de estradiol [BE]) (Jinks et al., 2013). No Brasil, a administração exógena de E_2 (BE ou CE) durante protocolos de sincronização da ovulação é uma prática comum, sendo administrado no momento da remoção do implante de P_4 (Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009). Sá Filho et al. (2011) demonstraram que a administração de CE na altura da remoção do implante de P_4 fez aumentar não só a proporção de vacas Nelore exibindo cio, como também a taxa de gestação, em comparação com vacas tratadas com GnRH (Martins et al., 2014).

Gestações bem-sucedidas requerem uma sincronia perfeita entre o desenvolvimento do embrião e o ambiente uterino (Perry et al., 2014). Para além do E_2 produzido pelo folículo em crescimento, os requisitos maternos para a obtenção/manutenção de um embrião viável incluem, a ovulação de um oócito competente, a produção adequada de P_4 pelo CL e a oferta de um ambiente uterino adequado. Nas fêmeas bovinas, a P_4 produzida pelo CL é necessária para a manutenção da gestação, bem como para o crescimento e desenvolvimento embrionários (Perry et al., 2007).

Nesta espécie, existe uma correlação positiva entre o diâmetro do FPO, a concentração plasmática de E_2 e a taxa de gestação subsequente (Perry et al., 2007). Especula-se que o diâmetro do FPO é importante para o desenvolvimento posterior do CL e, portanto, para o sucesso na concepção (Rahman et al., 2012). A capacidade do CL para produzir P_4 depende do número de células da granulosa do folículo ovulatório, estando assim, directamente relacionada com o diâmetro do FPO. Um maior folículo apresenta maior número de células da granulosa e, por conseguinte, maior serão a dimensão e o potencial esteroidogénico do futuro CL (Busch et al., 2008; Binelli et al., 2009; Pfeifer et al., 2012).

O desempenho reprodutivo das vacas de carne também é influenciado pela pontuação ("*score*") da sua condição corporal (SCC) (Bossis et al., 2000). A restrição alimentar crónica ou aguda resulta numa redução gradual ou rápida da taxa de crescimento do folículo dominante (FD), bem como, do seu diâmetro máximo. Os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, sabe-se que a restrição alimentar é capaz de suprimir a secreção de LH em vacas de carne (Bossis et al., 1999). As

alterações nas concentrações sanguíneas de insulina, hormona de crescimento (GH), factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), glucose e ácidos gordos não esterificados (AGNE) são indicadores da disponibilidade de energia, podendo, a curto ou longo prazo, fornecer sinais dos efeitos da nutrição sobre a secreção de LH (Bossis et al., 2000).

Posto isto, o objectivo principal do presente trabalho prendeu-se, sobretudo, com a análise de uma potencial relação entre o diâmetro folicular e a CC e a TG em bovinos *Bos indicus* sujeitos a um protocolo de IATF.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Caracterização da exploração e dos animais utilizados

O trabalho experimental realizou-se no Brasil, de 1 de Outubro de 2014 a 1 de Janeiro de 2015, na fazenda da Universidade de São Paulo, em Pirassununga (USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil; área total de 2268,033 hectares; Latitude: 21º59´46"S, Longitude: 47º25´33"O). Para a realização do trabalho foram utilizadas 376 vacas *Bos indicus* (ver Tabela 4), da raça Nelore e Tabapuã (91 primíparas; 285 multíparas), em fase de pós-parto. Durante esse período, os animais foram submetidos a um sistema de criação extensivo em pastagem (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*), com suplementação mineral e fornecimento de água *ad libitum*. Anualmente, no início da Primavera, as vacas são desparasitadas (Abamectina), sendo vacinadas contra as Clostridioses, 60 dias antes do parto. Entre os 20 e os 30 dias após o parto são novamente desparasitadas e vacinadas contra IBR, BVD e Leptospirose. Na altura do desmame, as vacas recebem as vacinas contra a raiva e a febre aftosa. São também realizados anualmente, os exames de brucelose (soro aglutinação) e o teste da intradermotuberculinização comparada.

Tabela 5 - Animais utilizados durante o trabalho experimental.

Variáveis	Primíparas	Multíparas	Total
Raça			
Nelore	65	265	330
Tabapuã	26	20	46
Total	91	285	376

5.2.2. Protocolo de Sincronização

Aos 50 ± 3 dias pós-parto, todas as vacas, em fase aleatória do ciclo éstrico, foram sujeitas a um protocolo de sincronização da ovulação, que consistiu num protocolo de três maneios, sendo: D0 = inserção do dispositivo intravaginal de Progesterona (P_4; *Cronipress® monodose 0,7g, Biogénesis Bagó*) e administração intramuscular de 2 mg de benzoato de

E_2 (BE; *Bioestrogen®, Biogénesis Bagó*); D8 ou D8,5 = remoção do dispositivo intravaginal de P_4 + administração intramuscular de 1 mg de BE (*Bioestrogen®, Biogénesis Bagó*) e 0,150 mg de D-cloprostenol ($PGF_{2\alpha}$; *Croniben®, Biogénesis Bagó*), e ainda a administração intramuscular de 300 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG; *Biogon®, Biogénesis Bagó*) nas fêmeas que não apresentaram CL no início do protocolo e/ou tinham uma condição corporal <5; D9,5 ou D10 = IATF (realizada sempre pelo mesmo técnico), sendo esta intervenção realizada no D9,5 nas vacas em que a remoção do dispositivo ocorreu no D8 e, no D10, naquelas em que a remoção ocorreu no D8,5, respectivamente. Foi utilizado sémen de 15 touros. Importa ainda referir que a determinação do SCC foi efectuada no D0, com base numa escala de 9 pontos, onde 1 corresponde a um animal magro e 9 a um animal obeso.

Todas as informações acerca do protocolo utilizado, bem como maneios efectuados durante o mesmo são apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Protocolo de Sincronização da Ovulação utilizado durante o trabalho experimental.

Legenda: P_4 (Progesterona); BE (Benzoato de Estradiol); US (Ultrassonografia); SCC (Pontuação de Condição Corporal); eCG (Gonadotrofina coriónica equina); IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo); ØFPO (Mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório).

5.2.3. Ultrassonografia e detecção dos cios

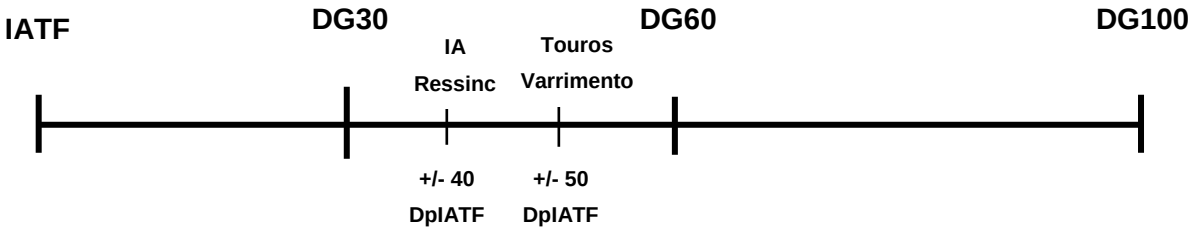
Os ovários de todas as vacas foram examinados aos dias 0, 8/8,5 e 9,5/10, por ultrassonografia transrectal (Ecógrafo - *Mindray DP-2200Vet* com sonda linear de 5,5 MHz), com o objectivo de se caracterizar o desenvolvimento folicular. O diâmetro do FD foi determinado no dia da IATF, através do cálculo da média das dimensões correspondentes ao diâmetro maior do folículo e ao comprimento da linha em ângulo recto com a primeira medição, através de uma funcionalidade do *Mindray DP-2200Vet*. A ciclicidade foi determinada com base na presença de um CL no dia 0. A detecção dos cios foi realizada em todas as vacas, no dia da IATF (D9,5/10), à entrada do tronco, através do método de

pintura da base da cauda. As vacas foram marcadas no D8/8,5, utilizando-se para tal um marcador *Raidex* (Walmur, Porto Alegre, RS, Brasil). O diagnóstico do cio foi considerado positivo nas fêmeas sem qualquer marca tintorial na zona da base da cauda.

5.2.4. Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado por ultrassonografia transrectal (Ecógrafo - *Mindray DP-2200Vet* com sonda linear de 5,5 MHz) e executado sempre, pelo mesmo técnico (pós-doutorado em Reprodução Bovina). A visualização de um corno uterino com líquido, juntamente com a presença de um embrião viável (batimento cardíaco) e um CL no ovário ipsilateral ao corno gravídico foram os elementos utilizados como indicadores positivos de gestação. Aos 30 ± 2 dias após a IATF, foi realizado o primeiro diagnóstico de gestação (DG30). Nessa altura, as vacas com um DG negativo foram sujeitas a um programa de ressincronização (RESSINC), utilizando-se para tal, o mesmo protocolo de IATF. Dez dias após a IA do protocolo de RESSINC, foram colocados dois touros (sujeitos, previamente, a exames andrológico-sanitários), para cobrição de varrimento, os quais permaneceram com as vacas até a altura do DG100. Aos 60 ± 2 dias após a IATF, foi realizado o segundo diagnóstico de gestação (DG60). Nesse momento, foram confirmadas as gestações nos animais gestantes no DG30 e foi feito o primeiro DG às vacas sujeitas à RESSINC. Aos 100 ± 2 dias após a IATF foi realizado o terceiro diagnóstico de gestação (DG100). Neste momento, foram confirmadas as gestações nos animais gestantes da RESSINC, bem como, realizados os DG das vacas colocadas com os touros de varrimento.

Figura 19 - Procedimento utilizado para o diagnóstico de gestação durante o trabalho experimental. Original do Autor.



Legenda: IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo); IA (Inseminação Artificial); Ressinc (Ressincronização); DpIATF (dias após IATF); DG30 (Diagnóstico de gestação aos 30 dias após IATF); DG60 (Diagnóstico de gestação aos 60 dias após IATF); DG100 (Diagnóstico de gestação aos 100 dias após IATF).

5.2.5. Registo de dados e análise estatística

Ao longo do presente trabalho, as informações individuais de cada animal foram introduzidas numa única base de dados criada no programa informático *Microsoft Office Excel 2010*, a qual serviu como suporte para a construção de gráficos e tabelas e, ainda para o cálculo estatístico. As análises estatísticas foram realizadas com o recurso ao programa SAS versão 9.3 (SAS/STAT®, SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2012). Os modelos

estatísticos utilizados para avaliar os dados, tiveram em consideração 3 modelos diferentes, mas, em todos avaliando os efeitos principais de grupo. O primeiro modelo foi baseado no diâmetro do folículo no momento da IATF, onde as vacas foram divididas em duas classes (classe 1 - vacas com folículos de diâmetro entre 8,5 e 15 mm; classe 2 - vacas com folículos de diâmetro superior a 15 mm); o segundo modelo foi baseado no SCC ao início do protocolo, onde as vacas também foram divididas em duas classes (classe 1 - vacas com SCC <5; classe 2 - vacas com SCC ≥5). O terceiro modelo de estudo foi baseado na categoria do animal, sendo os grupos (1 - primíparas e 2 - multíparas).

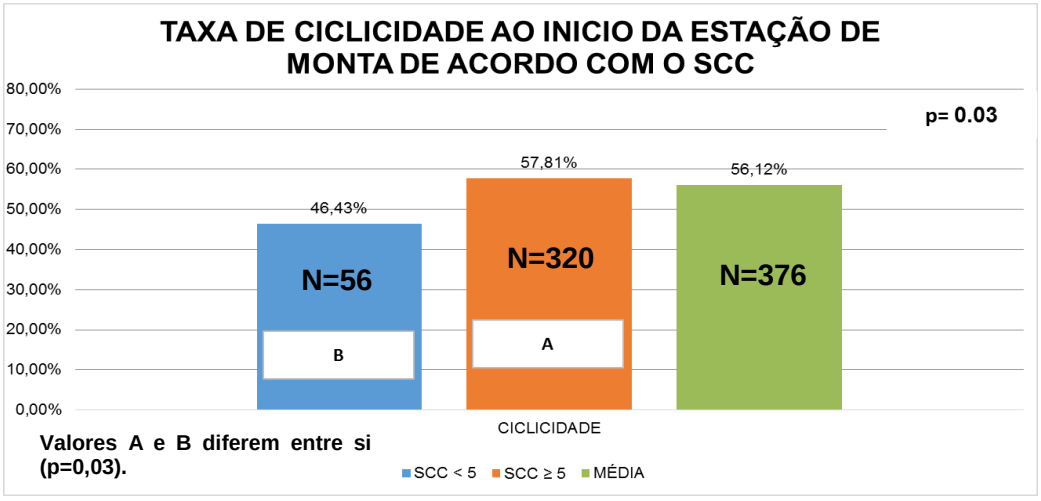
Para todas as variáveis foram realizadas análises de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk, SAS versão 9.3, 2012). As variáveis contínuas foram submetidas ao teste de médias pelo procedimento do PROC GLM do SAS versão 9.3, 2012. Os dados estão representados pela média, como medida de tendência central e pelo erro padrão da média, como medida de dispersão. O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese H0 (hipótese nula) para todos os dados obtidos foi P <0,05 e tendências estatísticas como P <0,10 foram consideradas na discussão dos resultados.

Importa referir que os animais sujeitos a RESSINC não entraram para a análise da taxa gestacional ao DG60. Apenas ao DG100 e juntamente com os animais sujeitos a repasse é que se procedeu à sua análise, sendo essa realizada com base no diâmetro do folículo na altura da IATF e no SCC ao início do protocolo de IATF.

5.3. RESULTADOS

No dia do início do protocolo de sincronização (D0), os animais apresentaram uma CC média de 5,35, sendo a dimensão média do CL e do folículo de 16,51 ± 4,86 mm e 12,37 ± 3,13 mm, respectivamente. A taxa de ciclicidade inicial foi de 56,12%, sendo estatisticamente superior nos animais com um SCC ≥5 (57,81%; p=0,03) (Gráfico 1). De acordo com a categoria dos animais, a ciclicidade inicial foi superior nas multíparas, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (57,19% vs. 52,75%; p=0,68).

Gráfico 1 - Taxa de ciclicidade ao início do protocolo de IATF (D0), de acordo com o SCC.



No dia da IATF e de acordo com a Tabela 5, é possível verificar que o FD foi, em média, superior nas fêmeas multíparas, em comparação com as primíparas (15,9 ± 1,8 mm vs. 14,3 ± 1,6 mm; p=0,05), sendo que também apresentaram um CL de maior diâmetro (14,8 ± 4,9 mm vs. 12,6 ± 4,6 mm; p=0,05). Em relação ao SCC, apesar das vacas com SCC ≥5 terem apresentado à IATF um FD de maiores dimensões (15,1 mm vs. 14,9 mm), essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa (p=0,53).

Tabela 6 - Efeito dos 3 modelos estudados (diâmetro do FD à IATF; SCC no inicio do protocolo; categoria dos animais) sobre alguns dados ováricos.

	CLIATF (mm)	EPM (±)	DIFCLIATF (mm)	EPM (±)	NFOLIATF	EPM (±)	DIFNFOLIATF	EPM (±)	FDIATF (mm)	EPM (±)	DIFFOIATF (mm)	EPM (±)
8,5 mm a 15 mm	14,9	2,8	-3,02	1,01	7,2	3,3	-0,87	0,53	**12.95 b**	2,4	**-0,19**	0,3
> 15 mm	14,5	3,1	-1,75	0,89	6,7	3,5	-0,93	0,47	**17.6 a**	3,6	**2.5 a**	0,8
Probabilidade	0,72	-	0,09	-	0,65	-	0,81	-	**0,03**	-	**0,04**	-
SCC<5	14,8	3,7	-2,1	0,65	7,1	3,9	-0,77	0,35	14,87	1,4	0,87	0,82
SCC≥5	14,7	4	-2,9	0,53	6,9	4,1	-1	0,29	15,1	2,1	1,23	0,62
Probabilidade	0,64	-	0,75	-	0,68	-	0,53	-	0,53	-	0,7	-
Primipara	**12.6 b**	4,6	2,2	0,29	7,4	4,5	-0,93	0,17	**14.3 b**	1,6	0,86	0,33
Multipara	**14.8 a**	4,9	1,9	0,17	7,3	4,7	-0,85	0,11	**15.9 a**	1,8	1,2	0,64
Probabilidade	**0,05**	-	0,65	-	0,86	-	0,76	-	**0,05**	-	0,7	-

Valores seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem entre si.

Legenda: CLIATF (diâmetro do CL à IATF); DIFCLIATF (diferença entre o diâmetro do CL à IATF e o diâmetro do CL à remoção do implante); NFOLIATF (nº de folículos à IATF); DIFNFOLIATF (diferença entre o nº de folículos à IATF e o nº de folículos à remoção do Implante); FDIATF (diâmetro do FD à IATF); DIFFOIATF (diferença entre o diâmetro do FD à IATF e o diâmetro do FD à remoção do implante); EPM (erro padrão da média).

5.3.1. Taxa de Gestação ao DG30

A TG ao DG30 foi de 60,11%. As vacas que revelaram à IATF folículos de diâmetro superior a 15 mm tiveram uma TG superior (68,33%), relativamente àquelas com diâmetro entre os 8,5-15 mm (52,55%), sendo essa superioridade estatisticamente significativa (p=0,008) (Gráfico 2). Em relação ao SCC, animais com SCC ≥5 apresentaram ao DG30 uma TG maior que os de SCC inferior a 5 (60,94% vs. 55,36%; p=0,05) (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com o diâmetro do FD à IATF.

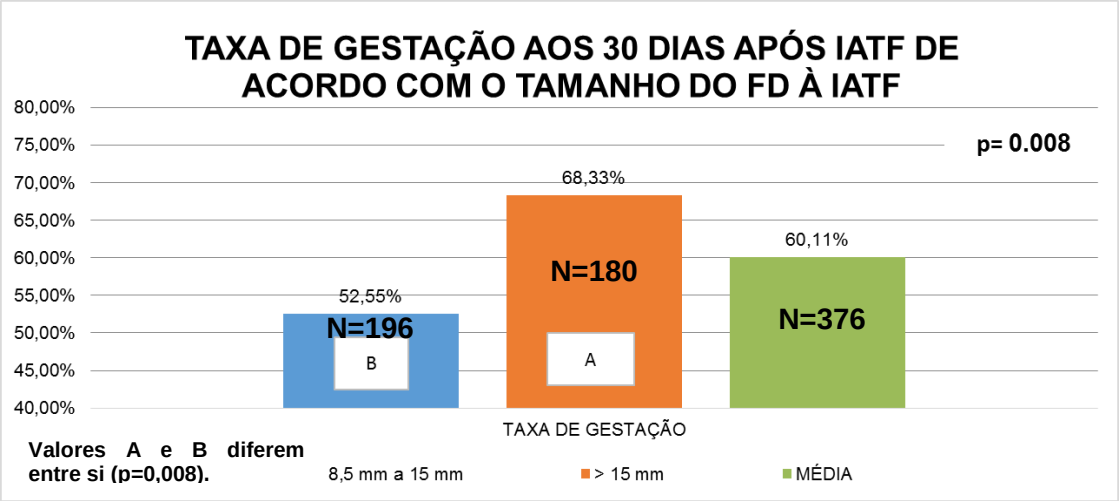
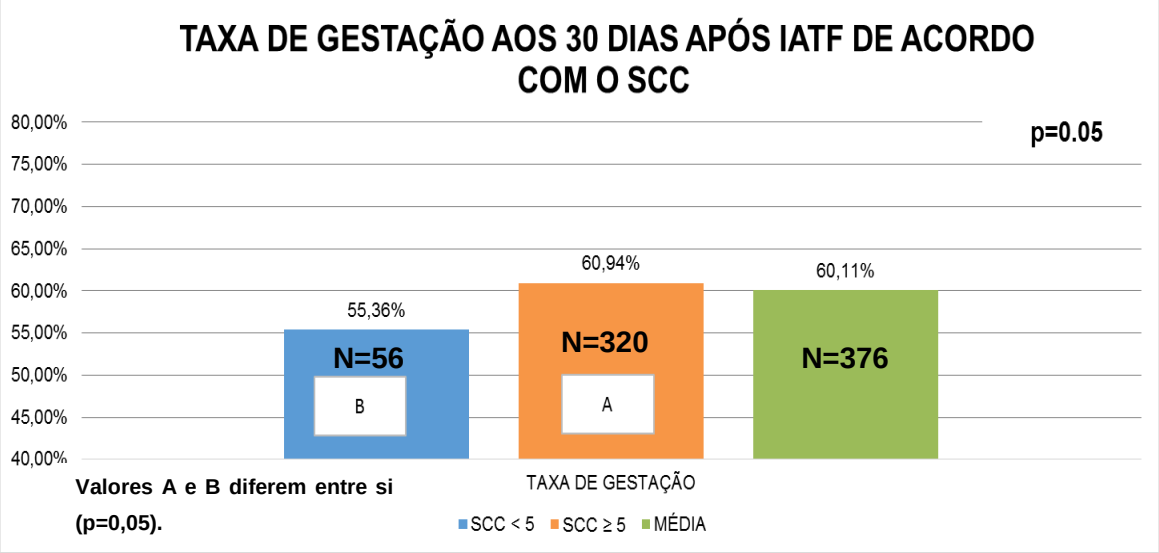
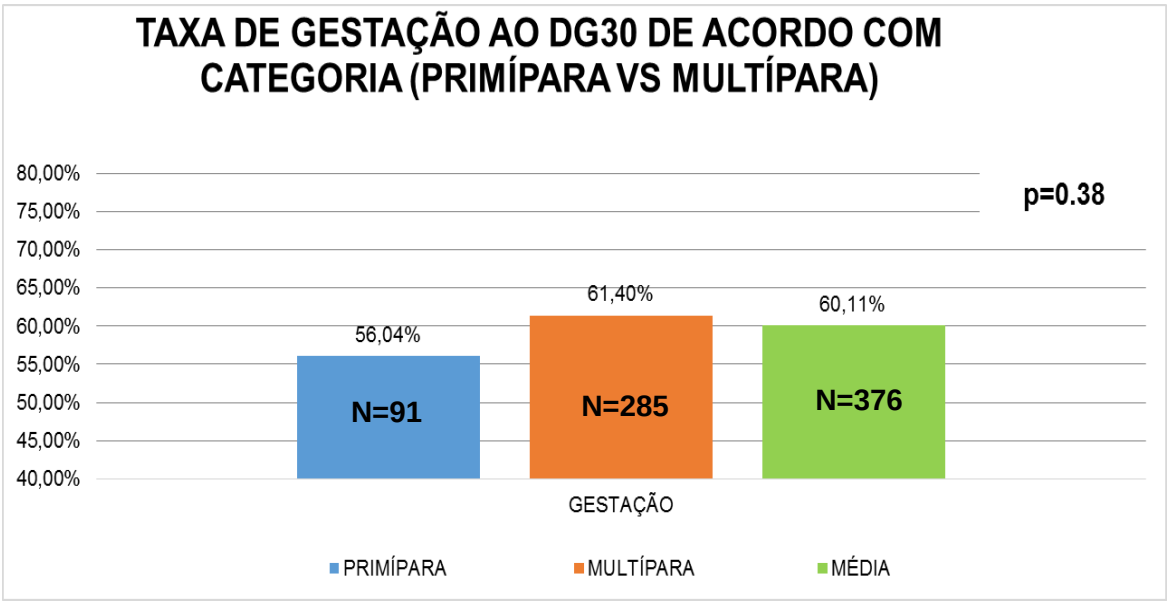


Gráfico 3 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com o SCC.



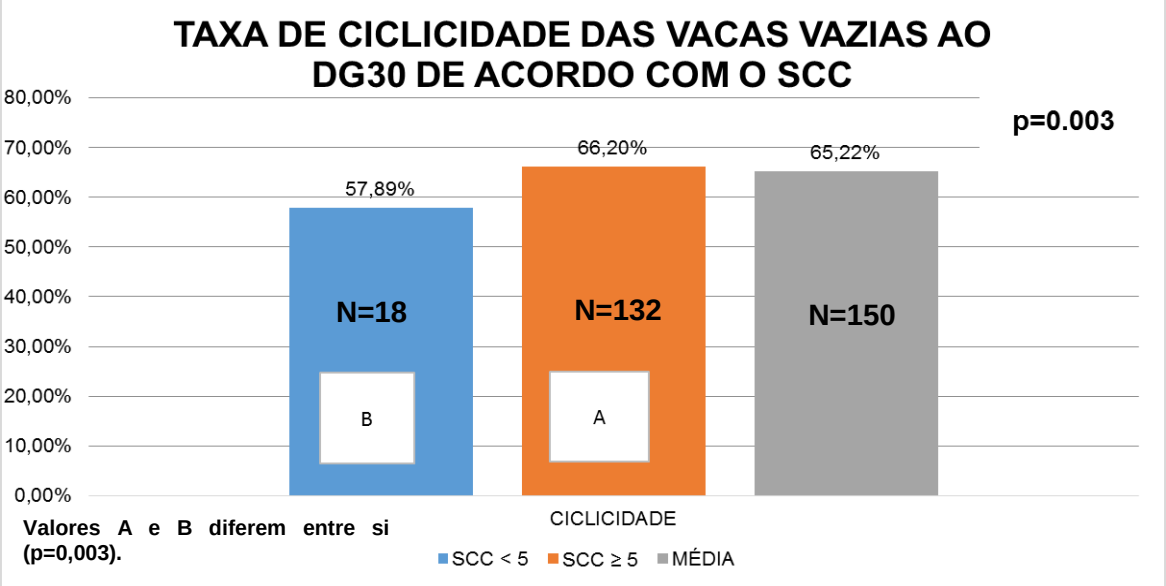
Ao contrário das variáveis anteriores, a categoria dos animais (primípara ou multípara) não fez variar de forma significativa a TG (p=0,38). No entanto, vacas multíparas registaram uma maior TG (61,40%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Taxa de gestação ao DG30 de acordo com a categoria dos animais.



Após a realização do DG aos 30 dias pós IATF, as fêmeas não-gestantes foram sujeitas a um novo protocolo de sincronização (igual ao inicial). A média das vacas cíclicas entre as fêmeas vazias foi de 65,22%; as que tinham um SCC ≥5 evidenciaram uma ciclicidade significativamente superior (66,20 vs. 57,89%; p=0,003) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Taxa de ciclicidade das vacas ressincronizadas ao DG30 de acordo com o seu SCC.



5.3.2. Taxa de Gestação ao DG60

A TG média ao DG60 foi de 55,05%. Comparando com o valor de DG30, verificou-se uma queda de 5,06%, que pode ser explicada pelo valor da perda embrionária/fetal registado. Esse valor, relativamente ao diâmetro do FD à IATF, foi inferior nas fêmeas com um diâmetro >15 mm (7,32% vs. 9,71%; p=0,44) (Gráfico 6). De acordo com o SCC, fêmeas com um SCC ≥5 apresentaram uma taxa de perda embrionária inferior (7,69% vs. 12,90%; p=0,17) (Gráfico 7). Relativamente à categoria dos animais esse valor foi inferior nas multíparas em comparação com as primíparas (7,43% vs. 11,76%; p=0,65) (Gráfico 8).

Apesar de ao DG60 a TG média ter sido um pouco inferior, também neste momento vacas que apresentaram um FD >15 mm à IATF mantiveram uma TG estatisticamente superior, em comparação com as que tinham um FD de diâmetro entre os 8,5-15 mm (63,33% vs. 47,45%; p=0,001) (Gráfico 6). As vacas com SCC ≥5, ao DG60 também mantiveram uma TG superior (56,25% vs. 48,21%; p=0,04) (Gráfico 7). De acordo com a categoria dos animais, as vacas multíparas ao DG60 revelaram uma TG superior à das primíparas (56,84% vs. 49,45%). No entanto, como no DG30, essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,51) (Gráfico 8).

Gráfico 6 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com o diâmetro do FD à IATF.

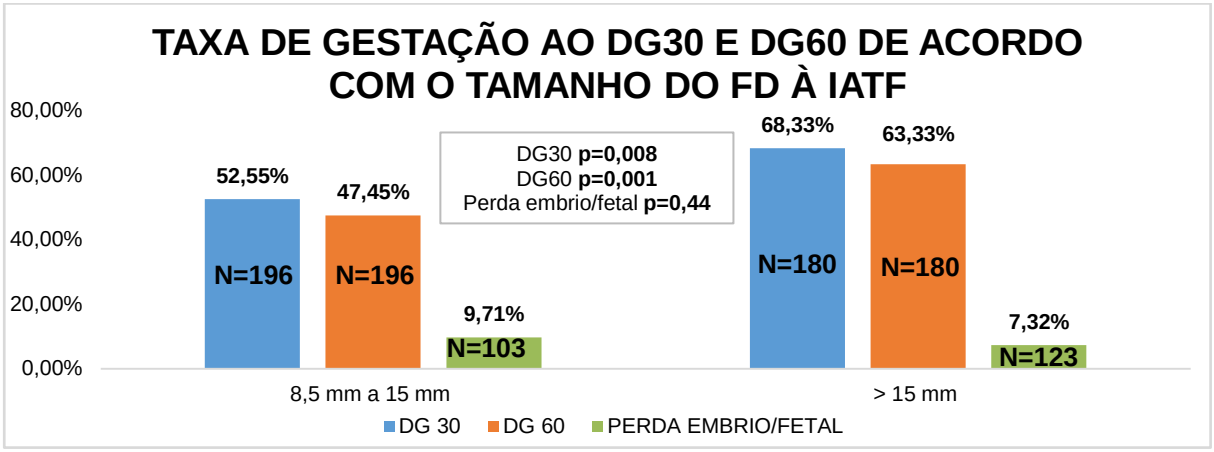


Gráfico 7 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com o SCC.

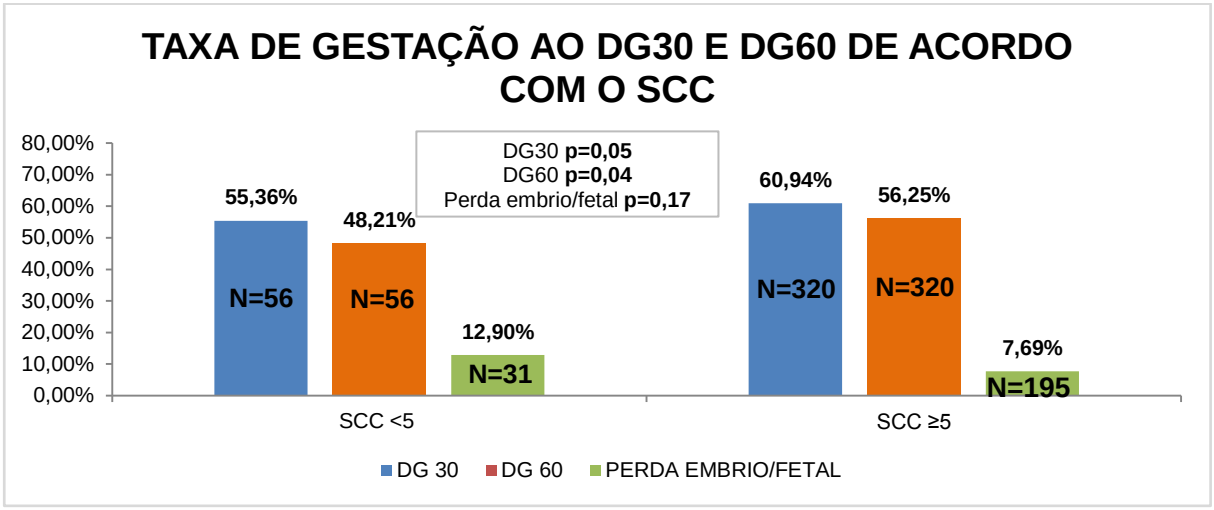
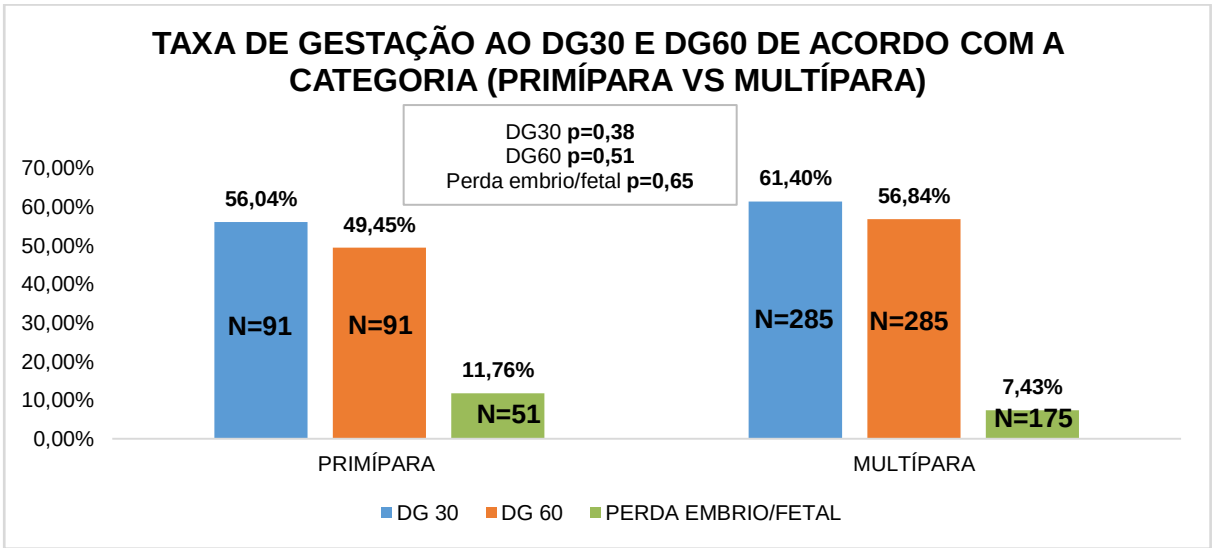


Gráfico 8 - Taxa de gestação ao DG60 e perda embrio/fetal entre o DG30 e o DG60 de acordo com a categoria das vacas.



5.3.3. Taxa de Gestação Final (DG100)

A TG final foi de 82,71%. Este valor refere-se à percentagem de vacas que, no final da estação de monta, se revelaram gestantes, quer tenha essa gestação sido resultado da IATF, da RESSINC ou ainda, dos touros de varrimento. É, portanto, um valor acumulado. Os Gráficos 9, 10, 11 apresentam a forma como essa TG foi influenciada pelo diâmetro do FD na altura da IATF, pelo SCC dos animais no início do protocolo e pela categoria dos mesmos. Para além disso, através deles também é possível perceber a forma como a TG variou ao longo do tempo. Importa referir que apenas o diâmetro do FD (p=0,03) e a categoria das vacas (p=0,01) influenciaram de forma significativa os valores da TG.

Gráfico 9 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com o diâmetro do FD à IATF.

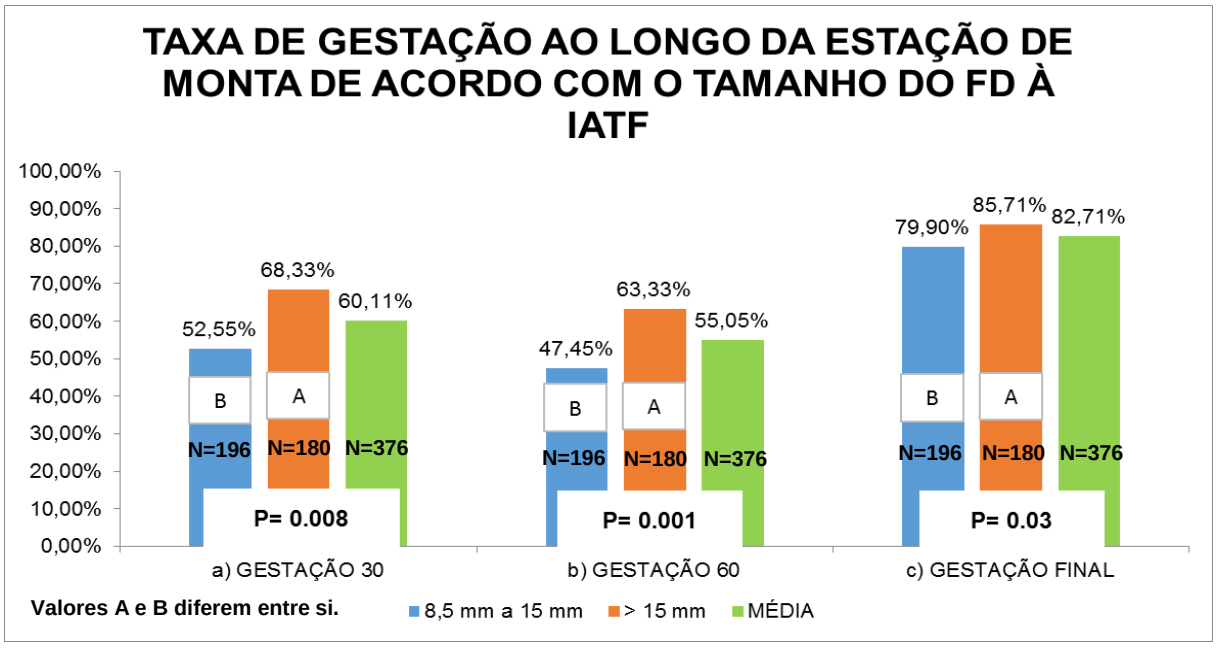


Gráfico 10 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com o SCC.

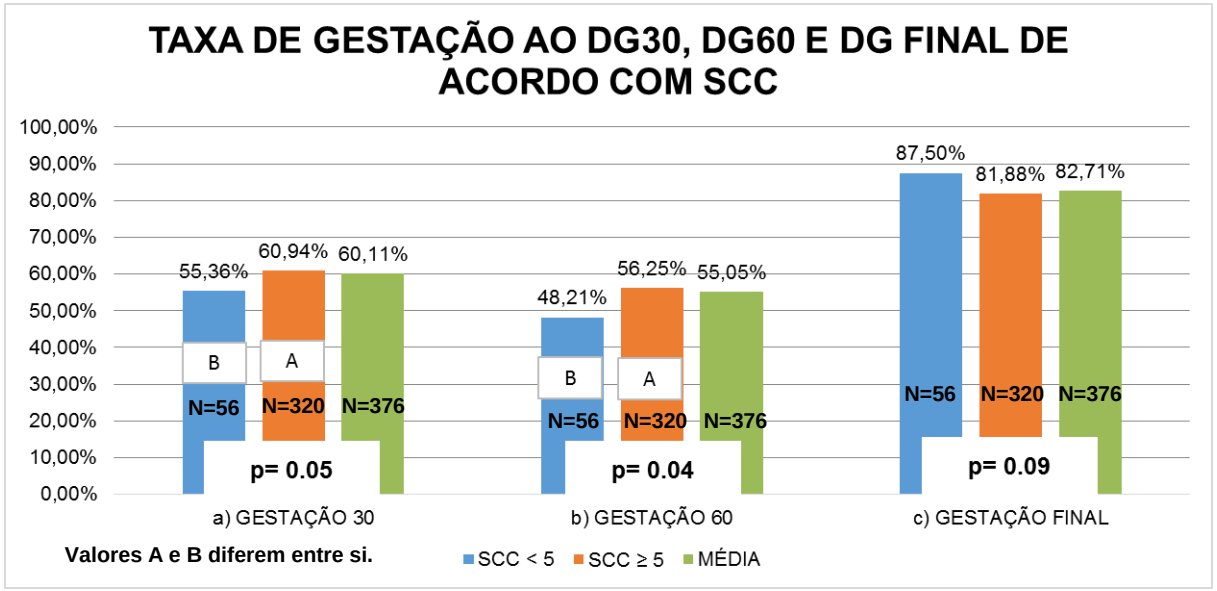
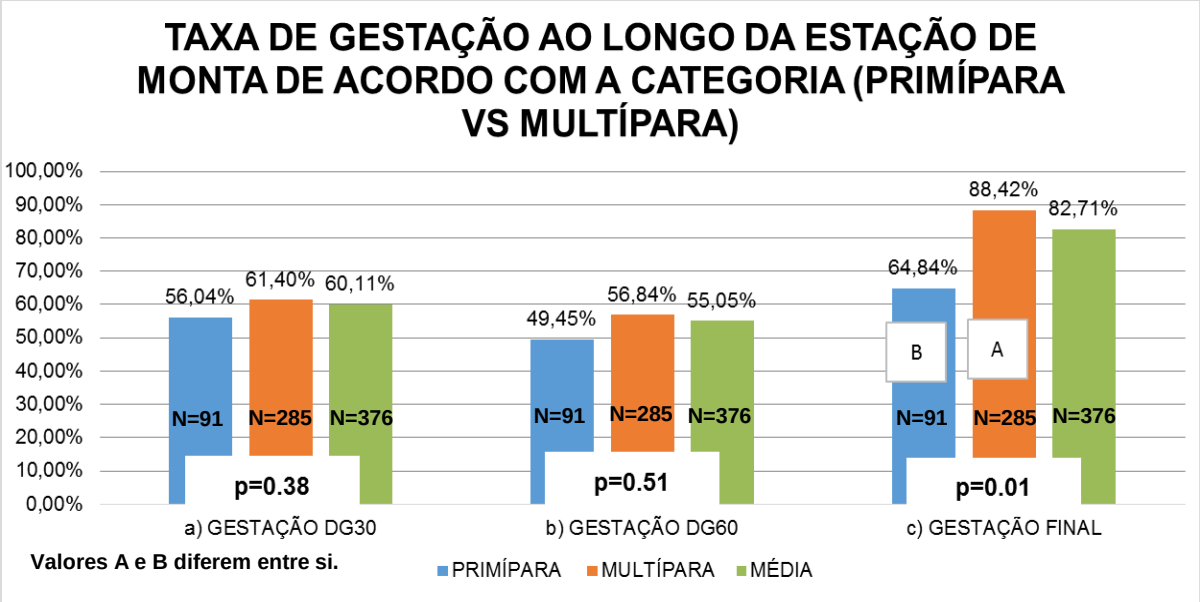


Gráfico 11 - Taxa de gestação ao longo da estação de monta de acordo com a categoria dos animais.



5.2. Discussão

A taxa de ciclicidade média ao início do protocolo foi de 56,12%, tendo sido estatisticamente superior nas vacas com um SCC ≥5 (57,81% vs. 46,43%; p=0,03), conforme já tinha sido observado por Ferreira, Miranda, Figueiredo, Costa & Palhano (2013). Nesse trabalho, as fêmeas com melhor SCC apresentaram maior taxa de ciclicidade ao início do protocolo. A ausência de ovulação, em situações de carência alimentar é segundo Rhodes et al. (1996), resultado de uma concentração de LH circulante insuficiente para estimular a maturação do folículo dominante. Relativamente à categoria das fêmeas, as vacas multíparas tiveram valores de ciclicidade mais elevados (57,19% vs. 52,75%; p=0,68), no entanto, sem significância estatística. A justificação para este achado prende-se com o facto das vacas primíparas apresentarem uma maior dificuldade no retorno à ciclicicidade ovárica após o parto, devido sobretudo às exigências energéticas acrescidas para o crescimento e amamentação (Mossman & Hanly, 1977 citados por Cunha, Fernandes, Garcia & Gioso, 2013).

No dia da IATF, o diâmetro do FD foi, em média, superior nas fêmeas multíparas, em comparação com as primíparas (15,9 ± 1,8 mm vs. 14,3 ± 1,6 mm; p=0,05), sendo que estas também apresentaram um CL de maior diâmetro (14,8 ± 4,9 mm vs. 12,6 ± 4,6 mm; p=0,05). Devido ao atraso do início da ciclicidade referido anteriormente, era de se esperar que nas primíparas o desenvolvimento da onda folicular estivesse comprometido, já que em situações de anestro, a síntese da hormona LH encontra-se afectada negativamente (Ambrose, 2015). Posto isto, é compreensível que as vacas primíparas, no momento da

IATF, evidenciem folículos e CLs de dimensão inferior aos encontrados em vacas multíparas.

A TG média ao DG30 foi de 60,11%. Este resultado pode ser considerado bastante satisfatório, já que diversos trabalhos apontam índices médios de concepção, de 45 a 65% para o gado de carne (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009; Sá Filho et al., 2010).

No presente estudo, as fêmeas que no dia da IATF apresentaram FPOs de diâmetro superior a 15 mm registaram ao DG30, DG60 e DG100 melhores taxas de gestação (TG), em comparação com as vacas com um FPO de diâmetro compreendido entre os 8,5-15 mm (68,33% vs. 52,55%, p=0,008; 63,33% vs. 47,45%, p=0,001; 85,71% vs. 79,90%, p=0,03, respectivamente). De acordo com os resultados encontrados, também Filho et al. (2013) verificaram diferenças significativas entre o diâmetro do folículo de vacas (*Bos indicus*) gestantes (13,33 ± 2,40 mm) e não gestantes (11,27 ± 2,75 mm). Martins et al. (2014) verificaram que novilhas *Bos indicus* com diâmetros foliculares entre 10,8 e 15,7 mm na altura da IATF tinham TG mais elevadas, que vacas com um diâmetro inferior. Segundo esses autores, o diâmetro folicular é o factor mais importante que afecta a TG de vacas Nelore sujeitas a um protocolo de IATF.

Uma justificação para os resultados encontrados, está de certa forma relacionada com o seguinte facto: folículos ovulatórios de maiores dimensões associam-se a maiores concentrações de E_2 durante o pró-estro (Vasconcelos et al., 2001; Sá Filho et al., 2009; Atkins, Smith, Wells, & Geary, 2010a, 2010b; Perry et al., 2014), a melhores taxas de ovulação (Gimenes et al., 2008; Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009; Sá Filho et al., 2009; Atkins et al., 2010a; Butler et al., 2011; Simões et al., 2012; Martins et al., 2014), a CLs de maiores dimensões (Vasconcelos et al., 2001; Pfeifer et al., 2012), a concentrações de P_4 superiores durante o diestro (Vasconcelos et al., 2001; Peres et al., 2009; Pfeifer et al., 2012), a uma maior taxa de crescimento e de capacidade de produção de IFN-t pelos embriões em estágio inicial (Mann, Lamming, Robinson & Wathes, 1998 citados por Peres et al., 2009) e a menores perdas embrionárias/fetais (Perry et al., 2005; Perry et al., 2007).

As concentrações de E_2, por altura da ovulação, desempenham um papel importante em determinados eventos que conduzem ao estabelecimento da gestação, entre eles o transporte de espermatozóides (Hawk, 1983 citado por Atkins et al., 2010a), o pH uterino (Perry & Perry, 2008), a maturação das células foliculares (McNatty, 1979 citado por Atkins et al., 2010a) e o ambiente tubárico (Buhi, 2002) e uterino (Miller & Moore, 1976; Ing & Tornesi, 1997, citados por Atkins et al., 2010a). Segundo Lopes, Butler, Gilbert & Butler (2007), o tamanho do FPO e as concentrações de E_2 no dia da IATF são superiores nas fêmeas que ficam gestantes, sendo aquele diâmetro folicular positivamente correlacionado com as concentrações séricas de E_2 do pró-estro (Atkins et al., 2010b). Assim sendo, uma maior concentração de E_2 durante esta fase, revela-se importante, pois é capaz de

influenciar de forma positiva a fertilização por meio da redução do pH uterino, melhorando o transporte dos espermatozóides e aumentando a longevidade dos mesmos até ao momento da ovulação (Perry & Perry, 2008).

Para além destes efeitos, essas concentrações elevadas de E_2 durante o pró-estro, produzidas por um folículo maduro, desempenham uma acção de *feedback* positivo sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise, aumentando as concentrações de GnRH e LH necessárias à ovulação (Sartori & Barros, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo também parecem estar de acordo com o facto de a melhor resposta ovulatória ter origem em folículos de maior diâmetro. Numa pesquisa efectuada por Butler et al. (2011), constatou-se que o diâmetro do folículo era superior em novilhas que ovulavam em relação às que não ovulavam, sugerindo assim que o sucesso dos protocolos de sincronização dependia do crescimento e do desenvolvimento do folículo dominante. Segundo Simões et al. (2012), a capacidade ovulatória de vacas Nelore parece estar relacionada com o aumento do diâmetro folicular e com a expressão do gene para a síntese dos receptores LH nas células da granulosa. Assim sendo, quanto maior for o diâmetro do FPO na altura da IATF maior será a sua capacidade ovulatória, o que pode justificar em parte a maior TG encontrada ao DG30, DG60 e DG100, nas fêmeas com maior diâmetro folicular.

Embora não se tenha mensurado e quantificado o diâmetro do CL e a concentração de P4, respectivamente, é possível que os resultados encontrados estejam também eles relacionados com o facto de maiores folículos ovulatórios originarem maiores CLs e, assim, maiores concentrações de P_4 durante o diestro (Vasconcelos et al., 2001; Peres et al., 2009; Atkins et al. 2010b). Pfeifer et al. (2012) encontraram uma correlação positiva entre o diâmetro do FPO e o diâmetro do CL e a concentração de P_4 no diestro subsequente. Esses autores constataram que vacas apresentando um FPO >19 mm tiveram um maior CL e uma maior concentração de P_4, que as vacas com um FPO <15 mm de diâmetro. Segundo Perry et al. (2005), esse facto pode ser resultado de um número maior de células da granulosa, resultando assim num maior número de células lúteas grandes no CL. No entanto, Busch et al. (2008) sugerem que não é o tamanho do folículo, mas sim a sua maturidade fisiológica que determinam a função lútea subsequente. Nessa pesquisa, as vacas que ovularam espontaneamente, não evidenciaram qualquer influência do tamanho folicular nas concentrações de P_4 posteriores. Ao que parece, a capacidade lútea das células da granulosa é influenciada sobretudo pelas concentrações de E_2 no fluido folicular (McNatty et al.,1979, citados por Busch et al., 2008). Segundo Perry et al. (2005), as concentrações intrafoliculares de E_2 desempenham um papel importante na aquisição da capacidade lútea por parte das células foliculares. Independentemente da razão, diversos estudos são unânimes (Vasconcelos et al., 2001; Peres et al., 2009; Atkins et al., 2010b; Sá Filho et al., 2011; Pfeifer et al., 2012) quanto ao facto de os FPOs de diâmetro superior estarem associados a concentrações de P_4 superiores durante o diestro seguinte, responsáveis pelo

sucesso gestacional. É essa evidência que poderá também ela justificar em parte os resultados encontrados no presente trabalho.

A concentração adequada de P_4, durante a fase posterior à ovulação, é importante para o sucesso gestacional, devido à sua acção ao nível da estimulação da secreção endometrial, do desenvolvimento embrionário, do reconhecimento materno da gestação e do estabelecimento e manutenção da gestação (Martins et al., 2014). Num trabalho de Lopes et al. (2007), o mau funcionamento do CL foi o principal responsável pela mortalidade embrionária tardia/fetal precoce observada. Com base nestes dados, facilmente se percebe o porquê de uma maior taxa de perda embrio-fetal do presente estudo estar também ela associada a vacas com um FPO de diâmetro ≤ 15 mm, sendo esse dado importante para justificar a queda dos valores gestacionais ao DG60. O crescimento e o desenvolvimento do concepto exigem a acção da P_4 no útero, para que esta regule a função endometrial. Elevadas concentrações de P_4 no período pós-concepção precoce, foram associadas a um alongamento mais eficiente do concepto (Mesquita et al., 2014), a um aumento na produção do INF-t e a taxas de gestação mais elevadas, em bovinos e ovinos (Lonergan, 2011). Por seu turno, vacas induzidas (com GnRH) a ovular folículos de dimensão <11,3 mm registaram um aumento da taxa de mortalidade embrionária (Perry et al., 2005).

Para além do diâmetro folicular na altura da IA, o sucesso dos programas de IATF relaciona-se também com o maneio alimentar do rebanho, principalmente em alturas criticas como os períodos pré e pós-parto. Só com um maneio correcto e eficiente é que poderá ocorrer a activação dos processos fisiológicos relacionados com a reprodução (Torres, Tineo & Raindan, 2015).

No presente trabalho, as vacas que no início do protocolo (D0) apresentaram um SCC ≥5 tiveram ao DG30 (60,94% vs. 55,36%) e DG60 (56,25% vs. 48,21%) uma TG estatisticamente superior (p=0,05 e p=0,04, respectivamente), que as fêmeas com uma pontuação inferior. No entanto, ao DG100, ao contrário do esperado, o cenário inverteu-se. Embora não estatisticamente significativa (p=0,09), a TG ao DG100 foi superior nas vacas com um SCC <5 (87,56% vs. 81,88%). Uma vez que para o cálculo da TG ao DG100 entraram todos os tipos de gestação (IATF, RESSINC, repasse) é possível que as vacas inicialmente com SCC inadequado (SCC <5) tenham beneficiado do tempo, ao longo da estação de monta, para recuperarem. A administração de eCG também poderá ter contribuído para essa recuperação. Esta afirmação é apoiada pelos resultados obtidos por Baruselli et al. (2003), citados por Ereno et al. (2007) e Dias et al. (2013), em que uma taxa de gestação mais elevada (55,1% vs. 38.9%, p <0,05) foi encontrada em vacas Nelore lactantes e acíclicas tratadas com 400 UI de eCG. Também Tortorella et al. (2013) encontraram resultados semelhantes, mas em vacas *Bos taurus*. Segundo eles, a administração de eCG dois dias antes da remoção do implante de P_4 foi responsável pelo aumento do diâmetro do folículo dominante, do volume lúteo, das concentrações séricas de

P_4, e por conseguinte das TG. Ereno et al. (2007) e Dias et al. (2013) afirmam que a adição de eCG a um tratamento de sincronização só faz sentido em situações de baixa CC e de baixa ciclicidade. É preciso por isso, ter alguma cautela na interpretação dos resultados relacionados com o SCC, uma vez que a eCG foi administrada apenas a animais com um SCC <5 ao início do protocolo.

Suportando os resultados registados ao DG30 e DG60, no presente trabalho, Torres et al. (2015) encontraram uma relação positiva entre o SCC (escala de 1-5) e a TG. Segundo eles, o aumento em 0,5 unidades do SCC implicou um incremento de 39% na probabilidade de gestação. Grecellé, Barcellos, Neto, Costa & Prates (2006) também observaram um efeito significativo entre o SCC e a probabilidade de gestação. De forma similar ao verificado por Torres et al. (2015), esses autores afirmaram que o aumento de 0,5 unidades no SCC elevaria em 34,1% a probabilidade de gestação. Ferreira et al. (2013) também demonstraram que as fêmeas com pior CC revelavam menor TG em comparação com as de melhor CC, quando sujeitas a programa de IATF.

O estado nutricional de bovinos de carne tem um grande peso no desempenho reprodutivo dos mesmos (Diskin et al., 2003) e, por conseguinte, na rentabilidade económica da exploração. O efeito da nutrição sobre a reprodução tem sido um tema amplamente estudado e segundo Diskin et al. (2003) é o resultado de determinados efeitos sistémicos sobre o hipotálamo (através da síntese e libertação de GnRH), a adeno-hipófise (através da síntese e da libertação de FSH, LH e da GH) e o ovário (através da regulação do crescimento folicular e da síntese de esteróides). De acordo com Bossis et al. (1999), a restrição alimentar em bovinos de carne suprime a secreção de LH, reduzindo também as concentrações de IGF-1, insulina e glucose e, aumentando a concentração plasmática de GH e de AGNE (Bossis et al., 1999). Embora não tenha sido objectivo deste trabalho mensurar a concentração de cada metabolito e, tendo em conta que todos eles representam importantes mediadores dos efeitos da ingestão alimentar e/ou do balanço energético, sobre a fertilidade da vaca (Diskin et al., 2003) é possível afirmar-se que todos tiveram provavelmente, a sua contribuição nos resultados encontrados.

Para além destes factores e de acordo com o trabalho de Meneghetti & Vasconcelos (2008), é possível que estes resultados agora registados estejam também eles relacionados com uma melhor taxa de sincronização do protocolo nas vacas com um SCC ≥5. Segundo os últimos autores, fêmeas com um SCC baixo têm uma taxa de sincronização inferior ($p < 0,05$), devendo-se essa situação à relação existente entre o grau do BEN e o intervalo entre o tratamento com P_4/E_2 e o início da nova onda folicular. Em situações de BEN, o eixo hipotálamo-hipófise torna-se hipersensível ao feedback negativo do E_2 comprometendo a secreção de LH e FSH, atrasando o início da nova onda folicular (Wiltbank et al., 2002 citados por Meneghetti & Vasconcelos, 2008). Dessa forma, o folículo presente no momento

da IATF pode ser mais jovem e de menor diâmetro, afectando o sucesso do tratamento (Meneghetti & Vasconcelos, 2008).

De acordo com a categoria dos animais (primípara ou multípara), vacas multíparas tiveram ao longo da estação de monta uma TG superior, relativamente às vacas primíparas. No entanto, essa superioridade só foi estatisticamente significativa ao DG100 (88,42% vs. 64,84%, p=0,01). Também Almeida et al. (2006), citados por Cunha et al. (2013) encontraram diferenças no desempenho reprodutivo, quando foram comparadas as categorias primíparas versus multíparas. Nas fêmeas primíparas, as TG foram inferiores durante toda a estação de monta. De acordo com Spitzer et al. (1995), citados por Torres et al. (2015), esse valor da TG das primíparas pode estar relacionado com o stress do parto, e com os efeitos combinados do crescimento e da primeira lactação, o que faz com que as exigências nutricionais se elevem, resultando em baixa resposta reprodutiva (intervalos de anestro mais longos). De acordo com Sonohata, Oliveira, Canuto, Abreu & Fernandes (2009), as vacas mais jovens são mais dependentes da CC para ficarem gestantes do que as vacas mais velhas. Aliado a tudo isso, é provável que as vacas mais velhas (multíparas) tenham sofrido um processo de selecção considerando-se o seu desempenho reprodutivo, sendo por isso, de se esperar que apresentem melhores TG.

5.3. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que o diâmetro folicular na altura da IATF possui um efeito estatisticamente comprovado no sucesso gestacional ao longo de toda a época de reprodução. Posto isto, para programas de IATF que utilizem P_4 e E_2, a adopção de estratégias que aumentem o diâmetro folicular na altura da inseminação, são de extrema importância para melhorar a fertilidade de vacas *Bos indicus* no pós-parto. Estas alternativas incluem, a redução da concentração de P_4 através do recurso a um dispositivo intravaginal reutilizado ou a estimulação da libertação de gonadotrofinas endógenas, através do tratamento antecipado com $PGF_{2\alpha}$ ou ainda, a administração exógena de gonadotrofinas.

Apesar do SCC das vacas ao início do protocolo não evidenciar um efeito estatisticamente significativo na taxa de gestação final, este mostrou ter um efeito preponderante na taxa de gestação aos 30 e 60 dias após a IATF. Providenciar uma condição corporal adequada aos animais, ao início da época de reprodução, é assim essencial para garantir resultados satisfatórios num programa de IATF, sendo a monitorização do SCC uma excelente ferramenta para aferir essas reservas corporais.

BIBLIOGRAFIA

Adams, G. P., & Singh, J. (2015). Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 219–244). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Ambrose, D. J. (2015). Postpartum Anestrus and its Management in Dairy Cattle. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 456–470). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Amstalden, M., & Williams, G. L. (2015). Neuroendocrine Control of Estrus and Ovulation. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 203–218). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Anderson, L. H. (1998). Managing Body Condition to Improve Reproductive Efficiency in Beef Cows. *Ruminant Nutrition Workshop*, 1–7.

Anderson, P., & Lewis, M. (n.d.). Effects of Body Condition and Energy Intake on Reproduction of Beef Cows. *University of Minnesota Extension*.

Atkins, J. A., Smith, M. F., Wells, K. J., & Geary, T. W. (2010a). Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous cows. *Journal of Animal Science*, *88*(7), 2311–2320.

Atkins, J. A., Smith, M. F., Wells, K. J., & Geary, T. W. (2010b). Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter and ovulation rate to GnRH in postpartum beef cows Part I: Cycling cows. *Journal of Animal Science*, *88*, 2300–2310.

Austin, E. J., Mihm, M., Ryan, M. P., Williams, D. H., & Roche, J. F. (1999). Effect of Duration of Dominance of the Ovulatory Follicle on Onset of Estrus and Fertility in Heifers. *Journal of Animal Science*, *77*(8), 2219–2226.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004a). Anatomy. In P. J. H. Ball & A. Peters (Eds.), *Reproduction in Cattle* (3ª ed., pp. 13–27). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004b). Artificial Control of the Oestrous Cycle. In P. J. H. Ball & A. Peters (Eds.), *Reproduction in Cattle* (3ª ed., pp. 110–123). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004c). Fertilization, Conception and Pregnancy. In P. J. H. Ball & A. Peters (Eds.), *Reproduction in Cattle* (3ª ed., pp. 56–67). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004d). Oestrous Behaviour and Its Detection. In P. J. H. Ball & A. Peters (Eds.), *Reproduction in Cattle* (3ª ed., pp. 92–109). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004e). The Ovarian Cycle. In P. J. H. Ball & A. Peters (Eds.), *Reproduction in Cattle* (3ª ed., pp. 40–55). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Baruselli, P. S. (n.d.). Reprodução de Bovinos. In Monika Ptaszynska (Ed.), *Compêndio de Reprodução Animal* (pp. 13–124). Intervet International.

Baruselli, P. S., Gimenes, L. U., & Sales, J. N. S. (2007). Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *31*, 205–211.

Baruselli, P. S., Reis, E. L., Marques, M. O., Nasser, L. F., & Bó, G. A. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 82–83, pp. 479–486).

Binelli, M., Ibiapina, B. T., & Bisinotto, R. S. (2006). Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinariae*, *34*(1), 1–597.

Binelli, M., Machado, R., Bergamaschi, M. A. C. M., & Bertan, C. M. (2009). Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Animal Reproduction*, *6*(1), 125–134.

Block, S. S., Butler, W. R., Ehrhardt, R. A., Bell, A. W., Van Amburgh, M. E., & Boisclair, Y. R. (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, *171*(2), 339–348.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., & Martínez, M. F. (2003). Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science*, *78*(3-4), 307–326.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., … Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, *57*(1), 53–72.

Bossis, I., Wettemann, R. P., Welty, S. D., Vizcarra, J. A., Spicer, L. J., & Diskin, M. G. (1999). Nutritionally Induced Anovulation in Beef Heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *Journal of Animal Science*, *77*(6), 1536–1546.

Bossis, I., Wettemann, R. P., Welty, S. D., Vizcarra, J. A., Spicer, L. J., & Diskin, M. G. (2000). Nutritionally Induced Anovulation in Beef Heifers: Ovarian and Endocrine Function During Realimentation and Resumption of Ovulation. *Biology of Reproduction*, *62*, 1436–1444.

Bridges, G. A., Helser, L. A., Grum, D. E., Mussard, M. L., Gasser, C. L., & Day, M. L. (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2alpha from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, *69*(7), 843–51.

Bridges, G. A., Mussard, M. L., Burke, C. R., & Day, M. L. (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*, *117*(3-4), 208–15.

Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction*, *123*(3), 355–362.

Busch, D. C., Atkins, J. A., Bader, J. F., Schafer, D. J., Patterson, D. J., Geary, T. W., & Smith, M. F. (2008). Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *Journal of Animal Science*, *86*(3), 553–563.

Butler, S. A. A., Phillips, N. J., Boe-Hansen, G. B., Bo, G. A., Burns, B. M., Dawson, K., & McGowan, M. R. (2011). Ovarian responses in Bos indicus heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F2α and equine chorionic gonadotrophin. *Animal Reproduction Science*, *129*(3-4), 118–126.

Butler, S. T., Marr, A. L., Pelton, S. H., Radcliff, R. P., Lucy, M. C., & Butler, W. R. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: Effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*, *176*(2), 205–217.

Carvalho, J. B. P., Carvalho, N. A. T., Reis, E. L., Nichi, M., Souza, A. H., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus x Bos taurus, and Bos taurus heifers. *Theriogenology*, *69*(2), 167–75.

Castro, F. C., Porcayo, J. O., López, R. J. A., Monforte, J. G. M., Pérez, R. C. M., & Correa, J. C. S. (2013). Effect of body condition score on estrus and ovarian function characteristics of synchronized beef-master cows. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *16*(2), 193–199.

Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L. A., Shephard, R. W., & Macmillan, K. L. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, *65*(1), 45–64.

Ciccioli, N. H., Wettemann, R. P., Spicer, L. J., Lents, C. A., White, F. J., & Keisler, D. H. (2003). Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *Journal of Animal Science*, *81*, 3107–3120.

Cipriano, R. S., Carvalho, B. A., Marangoni, N. R., & Nogueira, G. P. (2011). LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. *Animal Reproduction Science*, *127*(1-2), 16–22.

Colazo, M. G., & Mapletoft, R. J. (2014). A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle, *55*, 772–780.

Cunha, R. R., Fernandes, C. A. C., Garcia, J. A. D., & Gioso, M. M. (2013). Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelore lactantes acíclicas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, *65*(4), 1041–1048.

Dias, E. A. R., Arruda, R. P., Videschi, R. A., Graff, H. B., Sousa, A. M., Monteiro, F. M., … Oliveira, L. Z. (2013). O uso de ECG influencia a taxa de concepção em vacas Nelore de diferentes condições corporais submetidas ao mesmo protocolo de IATF? *Boletim de Indústria Animal*, *70*(3), 215–220.

Diskin, M. G., Austin, E. J., & Roche, J. F. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, *23*(1-2), 211–228.

Diskin, M. G., Mackey, D. R., Roche, J. F., & Sreenan, J. M. (2003). Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, *78*(3-4), 345–370.

Ereno, R. L., Barreiros, T. R. R., Seneda, M. M., Baruselli, P. S., Pegorer, M. F., & Barros, C. M. (2007). Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriónica equina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *36*(5), 1288–1294.

Estill, C. T. (2015). Initiation of Puberty in Heifers. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 195–202). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Ferreira, M. C. N., Miranda, R., Figueiredo, M. A., Costa, O. M., & Palhano, H. B. (2013). Impacto da condição corporal sobre a taxa de prenhez de vacas da raça nelore sob regime de pasto em programa de inseminação artificial em tempo fixo (iatf). *Semina: Ciências Agrárias*, *34*(4), 1861–1868.

Filho, A. L. R., Ferraz, P. A., Rodrigues, A. S., Bittencourt, T. C. B. S. C., Loiola, M. V. G., & Chalhoub, M. (2013). Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e a taxa de concepção em vacas Nelore. *Ciência Animal Brasileira*, *14*(4), 501–507.

Flores, R., Looper, M. L., Rorie, R. W., Hallford, D. M., & Rosenkrans, C. F. (2008). Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*, *86*(6), 1335–1344.

Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in Bos taurus cattle. *Animal Reproduction Science*, *124*(3-4), 163–169.

Fricke, P. M. (n.d.). Ovsynch, Pre-synch, the Kitchen-Synch: What's up with Synchronization Protocols?

Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Carvalho, N. A. T., Torres-Júnior, J. R. S., Souza, A. H., Madureira, E. H., … Baruselli, P. S. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. *Theriogenology*, *69*(7), 852–858.

Gordon, I. (2005a). Controlling Oestrus and Ovulation. In *Reproductive Technologies in Farm Animal* (pp. 140–163). Massachusetts, Cambridge-USA.

Gordon, I. (2005b). Introduction. In *Reproductive Technologies in Farm Animal* (pp. 1–48). Massachusetts, Cambridge-USA.

Gordon, I. (2005c). Pregnancy Testing Technology. In *Reproductive Technologies in Farm Animal* (pp. 215–234). Massachusetts, Cambridge-USA.

Grecellé, R. A., Barcellos, J. O. J., Neto, J. B., Costa, E. C., & Prates, E. R. (2006). Taxa de prenhez de vacas Nelore x Hereford em ambiente subtropical sob restrição alimentar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *35*(4), 1423–1430.

Herd, D. B., & Sprott, L. R. (1986). Body condition, nutrition and reproduction of beef cows. *Texas Agricultural Extension Service.*, (Texas A & M Univ.).

Houghton, P. L., Lemenager, R. P., Horstman, L. A., Hendrix, K. S., & Moss, G. E. (1990). Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *Journal of Animal Science*, *68*(5), 1438–1446.

Jinks, E. M., Smith, M. F., Atkins, J. A., Pohler, K. G., Perry, G. A., MacNeil, M. D., … Geary, T. W. (2013). Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, *91*(3), 1176–1185.

Kanitz, W. (2003). Follicular dynamic and ovulation in cattle: a review. *Archiv Für Tierzucht*, *46*(2), 187–198.

Kasimanickam, R. (2015). Pharmacological Intervention of Estrous Cycles. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 304–313). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Lamb, G. C., & Mercadante, V. R. G. (2015). Selection and Management of the Embryo Recipient Herd for Embryo Transfer. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 723–732). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Lane, E. A., Austin, E. J., & Crowe, M. A. (2008). Oestrous synchronisation in cattle-Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Animal Reproduction Science*, *109*(1-4), 1–16.

Lemley, C. O., Camacho, L. E., & Vonnahme, K. A. (2015). Maternal Recognition and Physiology of Pregnancy. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 245–256). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, *76*(9), 1594–601.

Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O., & Butler, W. R. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, *99*(1-2), 34–43.

Lucy, M. C. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science*, *85*, 89–99.

Lucy, M. C., McDougall, S., & Nation, D. P. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science*, *82-83*, 495–512.

Lucy, M. C., Staples, C. R., Michel, F. M., & Thatcher, W. W. (1991). Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *74*(2), 473–82.

Machado, R., Bergamaschi, M. A. C. M., Barbosa, R. T., de Oliveira, C. A., & Binelli, M. (2008). Ovarian function in Nelore (Bos taurus indicus) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology*, *69*(7), 798–804.

Machado, R., Corrêa, R. F., Barbosa, R. T., & Bergamaschi, M. A. C. M. (2008). *Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes*. São Carlos, SP.

Martínez, M. F., Kastelic, J. P., Bó, G. A., Caccia, M., & Mapletoft, R. J. (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, *86*(1-2), 37–52.

Martins, T., Peres, R. F. G., Rodrigues, A. D. P., Pohler, K. G., Pereira, M. H. C., Day, M. L., & Vasconcelos, J. L. M. (2014). Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nellore heifers. *Theriogenology*, *81*(3), 446–453.

Meneghetti, M., Sá Filho, O. G., Peres, R. F. G., Lamb, G. C., & Vasconcelos, J. L. M. (2009). Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*, *72*(2), 179–189.

Meneghetti, M., & Vasconcelos, J. L. M. (2008). Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, *60*(4), 786–793.

Mesquita, F. S., Pugliesi, G., Scolari, S. C., França, M. R., Ramos, R. S., Oliveira, M., … Binelli, M. (2014). Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, *81*(6), 861–9.

Nogueira, E., Batista, D. S. N., Filho, L. C. C. C., Dias, A. M., Silva, J. C. B., & Ítavo, L. C. V. (2014). Pregnancy rate in lactating Bos indicus cows subjected to fixed-time artificial insemination and treated with different follicular growth inducers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *43*(7), 358–362.

Öztürk, Ö. A., Cirit, Ü., Baran, A., & Ak, K. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrous dairy cows. *Theriogenology*, *73*(5), 568–576.

Peres, R. F. G., Claro, I., Sá Filho, O. G., Nogueira, G. P., & Vasconcelos, J. L. M. (2009). Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, *72*(5), 681–9.

Perry, G. A., & Perry, B. L. (2008). Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. *Journal of Animal Science*, *86*(11), 2928–2935.

Perry, G. A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., MacNeil, M. D., … Geary, T. W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5268–5273.

Perry, G. A., Smith, M. F., Roberts, A. J., MacNeil, M. D., & Geary, T. W. (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, *85*(3), 684–689.

Perry, G. A., Swanson, O. L., Larimore, E. L., Perry, B. L., Djira, G. D., & Cushman, R. A. (2014). Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology*, *48*(1), 15–20.

Peters, M. W., & Pursley, J. R. (2003). Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology*, *60*(6), 1197–1204.

Pfeifer, L. F. M., Leal, S. C. B. S., Schneider, A., Schmitt, E., & Corrêa, M. N. (2012). Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *41*(4), 1004–1008.

Pursley, J. R., & Bello, N. M. (2007). Ovulation Synchronization Strategies in Dairy Cattle Using PGF2α and GnRH. In P.Rudolph (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (2ª ed., pp. 286–293). St. Louis, Missouri: Saunders.

Rahman, M. S., Shohag, A. S., Kamal, M. M., Bari, F. Y., & Shamsuddin, M. (2012). Preovulatory Follicular and Subsequent Luteal Size Influence Pregnancy Success in Water Buffaloes. *Journal of Reproduction and Development*, *58*(2), 219–222.

Ramos, R. S., Oliveira, M. L., Izaguirry, A. P., Vargas, L. M., Soares, M. B., Mesquita, F. S., … Binelli, M. (2015). The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 39.

Raposo, M. A. (2013). *Estudo comparativo de dois protocolos de sincronização da ovulação em vacas da raça frísia holstein - Ovsynch e Doublesynch*. Universidade de Lisboa.

Rasby, R. J., Stalker, A., & Funston, R. N. (2007). Body Condition Scoring Beef Cows: A Tool for Managing the Nutrition Program for Beef Herds. *The Board of Regents of the University of Nebraska-Lincoln*, *EC281*(June).

Rhodes, F. M., Entwistle, K. W., & Kinder, J. E. (1996). Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in Bos indicus heifers. *Biology of Reproduction*, *55*(6), 1437–1443.

Ribeiro, A. C. (2015). *Controlo Reprodutivo em Bovinos*. Portugal: Publicações Ciência e Vida, Lda.

Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R. H. F., van Eerdenburg, F. J. C. M., & Hanzen, C. (2010). When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*.

Sá Filho, M. F., Baldrighi, J. M., Sales, J. N. S., Crepaldi, G. A., Carvalho, J. B. P., Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2011). Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science*, *129*(3-4), 132–9.

Sá Filho, M. F., Crespilho, A. M., Santos, J. E. P., Perry, G. A., & Baruselli, P. S. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. *Animal Reproduction Science*, *120*(1-4), 23–30.

Sá Filho, M. F., Santos, J. E. P., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., & Baruselli, P. S. (2011). Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, *76*(3), 455–463.

Sá Filho, M. F., Torres-Júnior, J. R. S., Penteado, L., Gimenes, L. U., Ferreira, R. M., Ayres, H., … Baruselli, P. S. (2010). Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. *Animal Reproduction Science*, *118*(2-4), 182–7.

Sá Filho, O. G., Meneghetti, M., Peres, R. F. G., Lamb, G. C., & Vasconcelos, J. L. M. (2009). Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, *72*(2), 210–218.

Sá Filho, O. G., Thatcher, W. W., & Vasconcelos, J. L. M. (2009). Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. *Animal Reproduction Science*, *112*(1-2), 95–106.

Sartori, R., & Barros, C. M. (2011). Reproductive cycles in Bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science*, *124*(3-4), 244–250.

Sartori, R., Bastos, M. R., Baruselli, P. S., Gimenes, L. U., Ereno, R. L., & Barros, C. M. (2010). Physiological differences and implications to reproductive management of Bos taurus and Bos indicus cattle in a tropical environment. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *67*, 357–375.

Short, R. E., & Adams, D. C. (1988). Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Journal of Animal Science*, *68*, 29–39.

Simões, R. A. L., Satrapa, R. A., Rosa, F. S., Piagentini, M., Castilho, A. C. S., Ereno, R. L., … Barros, C. M. (2012). Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*, *77*(1), 139–147.

Small, J. A., Colazo, M. G., Kastelic, J. P., & Mapletoft, R. J. (2009). Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, *71*(4), 698–706.

Sonohata, M. M., Oliveira, C. A. L., Canuto, N. G. D., Abreu, U. G. P., & Fernandes, D. D. (2009). Escore de condição corporal e desempenho reprodutivo de vacas no Pantanal do Mato Grosso do Sul – Brasil. *Revista Brasileira Saúde E Produção Animal*, *10*(4), 988–998.

Stevenson, J. S. (2007). Clinical Reproductive Physiology of the Cow. In P. Rudolph (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (2ª ed., pp. 258–270). St. Louis, Missouri: Saunders.

Swecker, W. S. (2015). Interaction of Nutrition and Reproduction in the Beef Cow. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 276–282). Ames, Iowa USA: John Wiley & Sons, Inc.

Thatcher, W. W., Moreira, F., Pancarci, S. M., Bartolome, J. A., & Santos, J. E. P. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology*, *23*(1-2), 243–254.

Torres, H. A. L., Tineo, J. S. A., & Raindan, F. S. S. (2015). Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte, *64*(247), 255–260.

Tortorella, R. D., Ferreira, R., dos Santos, J. T., Neto, O. S. A., Barreta, M. H., Oliveira, J. F., … Neves, J. P. (2013). The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology*, *79*(8), 1204–1209.

Vasconcelos, J. L. M., Pereira, M. H. C., Meneghetti, M., Dias, C. C., Sá Filho, O. G., & Peres, R. F. G. (2013). Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Animal Reproduction*, *10*(3), 206–214.

Vasconcelos, J. L. M., Sartori, R., Oliveira, H. N., Guenther, J. G., & Wiltbank, M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, *56*(2), 307–314.

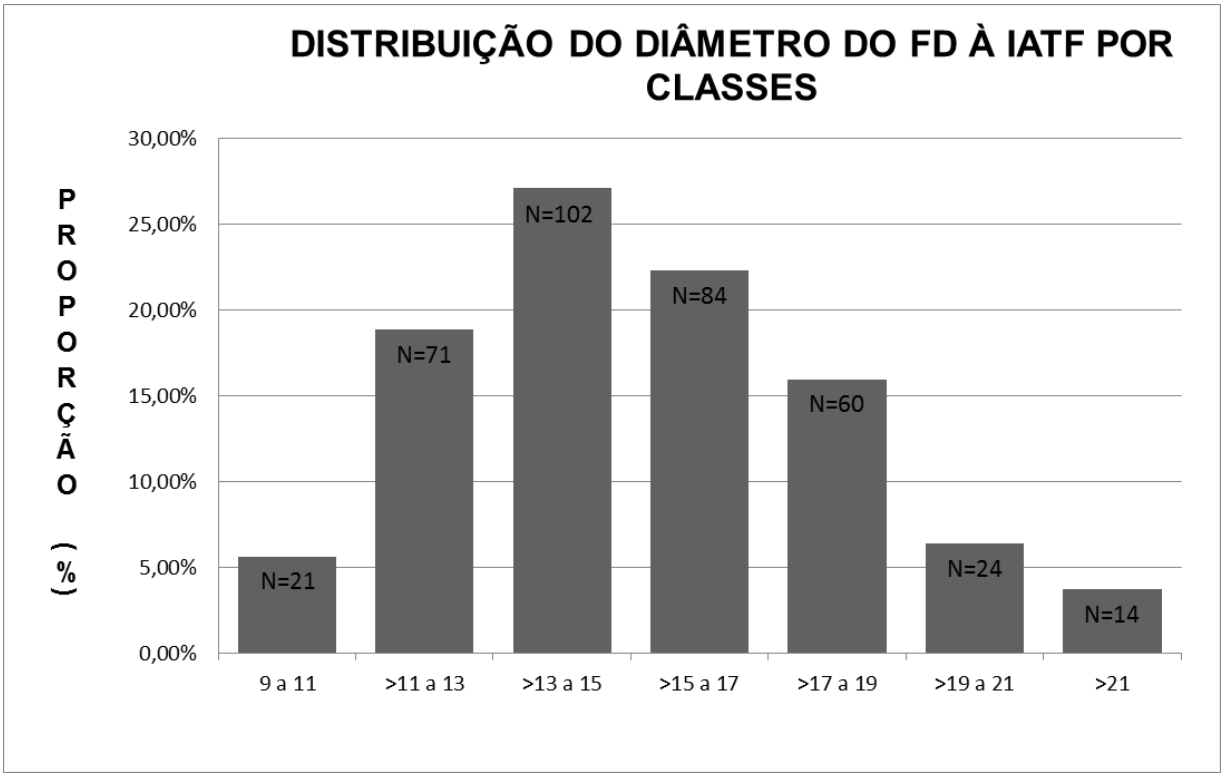
Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M., Pursley, J. R., & Wiltbanksa, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, *52*(99), 1067–1078.

Vizcarra, J. A., Wettemann, R. P., Spitzer, J. C., & Morrison, D. G. (1998). Body Condition at Parturition and Postpartum Weight Gain Influence Luteal Activity and Concentrations of Glucose, Insulin, and Nonesterified Fatty Acids in Plasma of Primiparous Beef Cows. *Journal of Animal Science*.

Youngquist, R. S., & Threlfall, W. R. (2007). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. (P. Rudolph, Ed.) (Vol. 27). St. Louis, Missouri: Saunders.

ANEXOS

Gráfico 12 – Distribuição do diâmetro do FD à IATF por classes.



Nas páginas que se seguem encontram-se os dados em formato *Excel* que serviram de base à construção dos gráficos utilizados no presente trabalho, bem como na análise estatística.

					INÍCIO DO PROTOCOLO (D0)					RETIRADA (D8/8,5)			IATF			DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO						
ORDEM DOS ANIMAIS	IDENTIFICAÇÃO	1- NELORE; 2- TABAPUÃ	1- VACA; 2-PRIMIPARA																			1- IATF; 2-RESSINCH; 3-TOURO1; 4-TOURO2; 5 - VAZIA
Nº	Vaca	RACA	CATEGORIA	LOTE	ECC	CL	CLMEDIA	FOLMEDIA	NFOL	CLMEDIA	FOLMEDIA	ECG	FOLMEDIA	FOLCLASS	TOURO	DG 30	DG 60	Perda 60	DG Final	TOURO 1	TOURO 2	TIPO PRENHEZ
1	3384	1	1	4	5	1	16,85	12,25	13	19,7	8,8	0	17,2	2	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
2	1421	1	1	4	7	0	.	12,4	6	.	19,6	0	19,35	2	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
3	3036	1	1	4	6	1	10,75	8,95	9	13,5	13,35	0	15,2	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
4	3264	1	1	4	7	1	15,05	12,4	8	.	17,25	0	21,25	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
5	3689	1	1	4	6	1	16,1	12,1	11	17,75	8,5	0	12,55	1	PAKAIR	0	.	0	1	.	.	2
6	3373	1	1	4	5	0	.	15,4	16	14	10,45	1	12,55	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
7	3681	1	1	4	6	1	18,45	16,95	6	12,95	14,1	0	16,3	2	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
8	3698	1	1	4	4	0	.	7,55	20	.	13,05	1	9,55	1	DUENDE	0	.	0	1	.	.	2
9	3122	1	1	4	5	0	.	7,15	10	.	14,05	1	14,05	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
10	1528	1	1	4	7	1	14,95	9,05	11	.	20,1	0	17,85	2	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
11	2992	1	1	4	6	1	14,85	10,4	12	.	15,55	0	12,2	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
12	3343	1	1	4	5	1	18,4	6,4	16	17,45	14,45	0	17,6	2	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
13	1383	1	1	4	6	1	13,65	7,15	14	.	15,95	0	17,45	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
14	1965	1	1	4	6	0	.	14	14	.	18,9	0	15,05	1	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
15	1781	1	1	4	5	0	.	8,75	9	.	15,05	1	16,75	2	JAMBO	1	1	1	1	.	.	1
16	3354	1	1	4	5	0	.	18	13	.	9,25	1	19,15	2	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
17	3553	1	1	4	5	1	15,9	10,05	8	12,8	17,05	0	16,3	2	JAMBO	0	.	0	1	.	.	2
18	3268	1	1	4	6	1	11,15	8	15	20,35	11,35	0	12,2	1	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
19	1592	1	1	4	4	1	17,05	9,2	15	.	16,05	1	14,9	1	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
20	1387	1	1	4	7	0	.	10,1	19	.	12,7	0	11,8	1	DUENDE	0	.	0	0	0	0	5
21	2027	1	1	4	4	1	17,05	12,3	9	.	16,65	1	22,2	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
22	3039	1	1	4	7	1	17,2	10,95	20	.	15,55	0	15,7	2	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
23	3394	1	1	4	5	0	.	11,4	17	.	15,85	1	14,75	1	LASTRO	0	.	0	1	.	.	2
24	3105	1	1	4	4	0	.	18,85	16	20,75	10,65	1	13,1	1	JACUMA	0	.	0	1	0	1	4
25	3080	1	1	4	7	0	.	16,7	22	.	16,25	0	16,65	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
26	3596	1	1	4	5	1	16,7	9,1	15	.	14,45	0	21,75	2	LASTRO	0	.	0	1	.	.	2
27	2991	1	1	4	5	1	13,1	14,3	7	17,15	14,25	0	16,75	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
28	2953	1	1	4	6	1	20,75	12,4	7	16,15	13,25	0	14,6	1	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
29	389	1	1	4	4	0	.	12,5	12	.	18,25	1	19,9	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
30	616	1	1	4	4	0	.	11,75	9	.	16,35	1	15,7	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
31	963	1	1	4	6	0	.	18,2	10	.	12,1	0	16,95	2	NEVAL	0	.	0	1	.	.	2
32	3277	1	1	4	5	0	.	15,6	14	13,85	14,95	1	14,95	1	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
33	3523	1	1	4	4	1	18,1	12,75	4	18,2	12,95	1	14,1	1	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
34	2104	1	1	4	7	1	20,15	13,1	18	17,85	12,7	0	13,65	1	JAMBO	0	.	0	1	1	.	3
35	3594	1	1	4	7	1	18,45	9,25	11	.	13,9	0	14,85	1	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
36	1558	1	1	4	7	1	12,6	8,1	11	21,8	9,5	0	11,35	1	LASTRO	0	.	0	1	0	1	4
37	1392	1	1	4	5	0	.	16,25	9	.	16,1	1	15,4	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
38	2979	1	1	4	6	1	14,65	12,15	12	13,9	10,2	0	15,4	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
39	1786	1	1	4	5	1	17,15	13,3	6	18	12,1	0	11,75	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
40	3340	1	1	4	6	1	16,35	14,4	12	.	12,4	0	13,6	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1

41	**3771**	1	1	6	6	0	.	14,55	8	19,4	12,55	0	11,7	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
42	**3968**	1	1	6	6	1	20	8,15	5	.	15,65	0	16,65	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
43	**4136**	1	1	6	5	1	15,5	12,35	11	15,15	14,7	0	15,85	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
44	**3832**	1	1	6	6	1	12,65	10	7	.	14,4	0	13,1	1	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
45	**4162**	1	1	6	6	0	.	13,1	9	14,25	11,15	0	14,75	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
46	**3813**	1	1	6	5	1	18,6	10,5	11	13,45	11,3	0	18,8	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
47	**3887**	1	1	6	5	0	.	10,75	10	12,75	13,35	1	14,35	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
48	**3827**	1	1	6	6	0	.	11,1	12	.	12,55	0	12,8	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
49	**4159**	1	1	6	5	0	.	13,85	8	.	15,8	1	13,4	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
50	**3933**	1	1	6	5	1	18	12,8	9	.	14,7	0	16,8	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
51	**3984**	1	1	6	5	0	.	14,3	13	.	14,65	1	15,15	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
52	**3835**	1	1	6	5	0	.	10,85	15	13,7	14,9	1	15,85	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
53	**3974**	1	1	6	6	0	.	7,25	15	.	13,65	0	17,85	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
54	**4031**	1	1	6	4	0	.	9,2	9	.	12,4	1	11,75	1	IMPERIOSO	0	.	0	1	1	.	3
55	**3948**	1	1	6	6	1	19,55	12,65	8	.	10,8	0	18,25	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
56	**4161**	1	1	6	5	1	10,65	8,9	11	14,95	12,65	0	15,6	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
57	**3989**	1	1	6	6	0	.	14,55	12	.	14,7	0	19,6	2	7522MN	0	.	0	0	0	0	5
58	**3834**	1	1	6	5	1	15	9,45	12	11,15	10,8	0	14,35	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
59	**4018**	1	1	6	5	0	.	17,2	13	.	9,05	1	14	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
60	**3977**	1	1	6	5	0	.	13,5	13	.	19,1	1	23,8	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
61	**4075**	1	1	6	6	0	.	15,65	22	.	14,8	0	12,8	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
62	**3853**	1	1	6	5	0	.	19,4	11	.	13,15	1	18,7	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
63	**3817**	1	1	6	5	1	13,85	12,9	16	13,7	16,9	0	18,85	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
64	**3828**	1	1	6	6	1	13,35	11,7	8	.	15,4	0	15,5	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
65	**4060**	1	1	6	6	0	.	15,8	17	14,55	14,65	0	14,65	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
66	**3794**	1	1	6	5	1	14,15	11,6	8	.	11,3	0	13,35	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
67	**4046**	1	1	6	6	1	13,85	15,1	6	13,45	11,2	0	16,95	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
68	**4058**	1	1	6	6	1	12,15	11,85	8	.	9,5	0	15,7	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
69	**4112**	1	1	6	6	0	.	16,65	13	15,8	18,2	0	20,65	2	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
70	**3976**	1	1	6	6	0	.	8,6	8	.	12,7	0	17,4	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
71	**3940**	1	1	6	5	0	.	13,45	17	.	10,75	1	13	1	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
72	**3773**	1	1	6	5	1	9,95	8,7	11	.	12,55	0	16,7	2	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
73	**4069**	1	1	6	6	0	.	13,55	13	15,7	18,5	0	19,45	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
74	**4124**	1	1	6	4	0	.	13,1	9	22,95	13,5	1	15,2	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
75	**3877**	1	1	6	6	0	.	8,7	16	17,35	12,3	0	14,35	1	7522MN	0	.	0	1	.	.	2
76	**4017**	1	1	6	5	0	.	12,45	12	.	13,15	1	11,65	1	7522MN	1	0	0	0	0	0	5
77	**3816**	1	1	6	5	0	.	14,3	15	.	13,85	0	16,35	2	IMPERIOSO	0	.	0	1	0	1	4
78	**4074**	1	1	6	6	1	15,9	12,9	10	.	14,9	0	18,8	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
79	**3915**	1	1	6	6	0	.	14,85	12	.	12,6	0	14,65	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
80	**3839**	1	1	6	4	0	.	14,35	7	.	13	1	9,9	1	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
81	**3947**	1	1	6	6	0	.	16,3	7	.	14,3	0	14,5	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
82	**4047**	1	1	6	6	1	17,1	10,25	7	14,2	10,7	0	13,7	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
83	**4103**	1	1	6	5	0	.	14,35	10	.	12,6	1	13,7	1	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
84	**3804**	1	1	6	5	1	10,9	10,05	10	14,65	12,9	0	14,95	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
85	**3789**	1	1	6	6	1	16,9	10,55	12	.	15,65	0	15	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
86	**3996**	1	1	6	5	0	.	15,55	11	11,2	12,4	1	12,7	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
87	**4099**	1	1	6	5	0	.	13,55	15	16,1	13,95	1	18,05	2	7522MN	0	.	0	1	.	.	2
88	**3831**	1	1	6	5	0	.	11,35	15	.	11,9	1	18,3	2	IMPERIOSO	0	.	0	1	1	.	3
89	**3778**	1	1	6	6	1	14,5	12,5	8	16,5	11,25	0	9,75	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
90	**3777**	1	1	6	5	0	.	6,6	7	.	13,05	1	14,2	1	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2

91	**3941**	1	1	6	5	0	.	17,8	16	.	18,05	1	9,15	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
92	**3861**	1	1	6	5	0	.	11,25	4	.	16,05	1	17,25	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
93	**3975**	1	1	6	5	1	15,95	9,9	12	.	13,6	0	16,4	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
94	**4029**	1	1	6	5	1	16,55	8,45	10	.	15,55	0	14,8	1	7522MN	0	.	0	1	.	.	2
95	**3841**	1	1	6	5	1	19,6	9,05	9	.	18,45	0	10,65	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
96	**4143**	1	1	6	6	1	16,15	13,1	8	.	13,35	0	13,3	1	JACUMA	0	.	0	1	1	.	3
97	**3907**	1	1	6	6	0	.	14,7	4	.	18,7	0	22,9	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
98	**3814**	1	1	6	5	0	.	14,6	11	11,7	12,15	0	16,3	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
99	**4114**	1	1	6	5	1	14,3	11,9	10	.	9,6	0	12,2	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
100	**3935**	1	1	6	5	1	14,15	8,85	15	.	10	0	11,45	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
101	**3909**	1	1	6	6	1	11	9,3	6	.	10,3	0	11,85	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
102	**3798**	1	1	6	6	1	18,5	14,35	9	13,1	10,65	0	11,75	1	IMPERIOSO	0	.	0	0	0	0	5
103	**3791**	1	1	6	5	1	16,8	14,2	9	13,55	11,45	0	18	2	IMPERIOSO	0	.	0	1	.	.	2
104	**3810**	1	1	6	5	1	18,4	14	7	15,35	16,85	0	18,35	2	7522MN	0	.	0	1	.	.	2
105	**3962**	1	1	6	6	1	18,8	13,3	7	.	16,85	0	13,15	1	IMPERIOSO	0	.	0	1	.	.	2
106	**3873**	1	1	6	6	1	20,7	11,35	9	11,15	11,6	0	16,4	2	IMPERIOSO	0	.	0	1	.	.	2
107	**3775**	1	1	6	6	0	.	13	12	13,85	10,8	0	15,1	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
108	**3783**	1	1	6	5	0	.	11,6	11	.	13,45	1	14,8	1	7522MN	0	.	0	1	0	1	4
109	**3779**	1	1	6	6	1	21,7	12,8	6	21,7	9,9	0	13,85	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
110	**4061**	1	1	6	5	0	.	15,45	10	12,15	10,5	1	13,3	1	IMPERIOSO	0	.	0	1	0	1	4
111	**3838**	1	1	6	6	0	.	14,9	13	.	17,45	0	13,55	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
112	**3946**	1	1	6	4	0	.	19,65	6	.	14,95	1	20,1	2	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
113	**3997**	1	1	6	5	0	.	11,95	12	.	10	1	11,35	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
114	**4035**	1	1	6	4	0	.	9,65	9	.	16,6	1	17,6	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
115	**1911**	1	1	5	5	0	.	16,65	12	14,9	12,15	1	15	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
116	**2984**	1	1	5	4	1	13,5	10,85	14	.	17,15	1	11,5	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
117	**2990**	1	1	5	4	1	14,05	7,8	9	.	9,25	1	11,45	1	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
118	**3116**	1	1	5	5	1	13,25	10,95	9	15,6	14,55	0	15,25	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
119	**3558**	1	1	5	5	1	19,3	12	10	13,35	11,75	0	15,9	2	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
120	**3403**	1	1	5	6	0	.	13,75	8	.	14,7	0	20,6	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
121	**2999**	1	1	5	5	0	.	12,75	12	.	12	1	17,4	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
122	**1412**	1	1	5	4	1	13,45	9,35	10	.	13,55	1	15,8	2	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
123	**813**	1	1	5	6	1	19,75	18,55	7	.	22,45	0	11,1	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
124	**660**	1	1	5	6	1	19,1	16,2	17	.	14,85	0	12,25	1	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
125	**2978**	1	1	5	4	1	11,9	8,6	9	.	16,3	1	17,75	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
126	**1973**	1	1	5	5	0	.	11,05	11	14,2	13,2	1	12,5	1	JAMBO	0	.	0	1	1	.	3
127	**3730**	1	1	5	6	0	.	11,65	11	.	11,6	0	15,5	2	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
128	**2943**	1	1	5	5	1	14,55	7,7	14	20,8	11,65	0	14,45	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
129	**3215**	1	1	5	4	0	.	12,9	10	.	13,4	1	15	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
130	**3485**	1	1	5	4	0	.	14,8	6	.	16,45	1	19,6	2	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
131	**2968**	1	1	5	5	1	15,05	8,5	13	22,2	12,9	0	14,3	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
132	**3500**	1	1	5	6	0	.	14,35	6	19,35	11,4	0	11,55	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
133	**1993**	1	1	5	6	1	19,85	12,3	9	20,2	11,8	0	11,65	1	NEVAL	0	.	0	1	.	.	2
134	**1447**	1	1	5	5	1	13,15	10,75	7	32,05	8,7	0	16,55	2	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
135	**3293**	1	1	5	4	0	.	13,5	9	.	13,6	1	14,3	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1

136	1429	1	1	5	5	1	26,5	12	12	17,05	12,3	0	13,45	1	JACUMA	1	0	0	0	0	0	5
137	3489	1	1	5	5	0	.	10,75	10	21,95	13,65	1	15,1	2	JAMBO	0	.	0	1	1	.	3
138	3462	1	1	5	5	1	17,75	11,5	16	.	13,95	0	9,75	1	DUENDE	0	.	0	1	1	.	3
139	3124	1	1	5	5	0	.	17,15	7	.	10,15	1	25,35	2	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
140	3726	1	1	5	5	0	.	8,55	9	.	15,1	1	13,2	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
141	1986	1	1	5	6	1	22	12,75	9	11,9	13,05	0	11,9	1	JACUMA	0	.	0	1	1	.	3
142	1878	1	1	5	6	1	20,9	8,9	10	.	14,05	0	10,85	1	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
143	3422	1	1	5	6	1	16,5	9,45	17	18,95	10,1	0	11,3	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
144	3349	1	1	5	5	1	16,55	9,4	13	17,1	10,8	0	11,45	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
145	1856	1	1	5	5	1	10,1	8,1	12	19,85	11,55	0	10,95	1	DUENDE	0	.	0	1	.	.	2
146	2916	1	1	5	5	1	11,1	9,85	13	22,55	10,9	1	11,9	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
147	3397	1	1	5	6	1	14,2	8,8	9	.	10,35	0	14,05	1	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
148	1784	1	1	5	5	1	17,25	9,5	11	.	15,6	0	14,15	1	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
149	3539	1	1	5	5	1	15,75	7,65	7	12,15	14,15	0	11	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
150	3393	1	1	5	5	0	.	13,15	13	20,45	12,95	1	12,15	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
151	3163	1	1	5	5	1	17,05	9,2	10	15,75	10,3	0	10,95	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
152	1524	1	1	5	6	1	17,85	13,6	8	19,5	12,8	0	10,75	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
153	2956	1	1	5	6	0	.	14,85	10	20,15	12,45	0	15,5	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
154	1417	1	1	5	4	0	.	14,8	11	22,65	11,65	1	10,45	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
155	2917	1	1	5	5	0	.	15,8	8	.	13,05	1	15,85	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
156	3186	1	1	5	5	1	12,55	10,1	7	.	12,05	0	9,85	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
157	3428	1	1	5	5	1	16,35	9,5	13	.	12,75	0	15,7	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
158	2958	1	1	5	7	1	19	9,75	19	17,9	8,5	0	10,25	1	PAKAIR	0	.	0	1	.	.	2
159	3276	1	1	5	4	0	.	14,85	9	.	15,95	1	21,75	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
160	1813	1	1	5	6	1	22,95	11,35	12	17,4	9,6	0	12,1	1	GURCA	0	.	0	1	.	.	2
161	3424	1	1	8	4	1	13,3	10,3	6	13,95	10,8	1	16,45	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
162	3527	1	1	8	5	1	16,7	14,55	11	15,2	12,55	0	12,9	1	NEVAL	0	.	0	1	1	.	3
163	3237	1	1	8	6	1	18,5	9,3	9	.	15,25	0	14,9	1	GURCA	1	1	1	1	.	.	1
164	2928	1	1	8	5	0	.	18	8	19,2	19,5	1	18,55	2	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
165	3458	1	1	8	5	0	.	8,95	8	19,2	12,7	1	12,05	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
166	3521	1	1	8	5	0	.	13,25	7	.	14,5	1	20,2	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
167	3015	1	1	8	5	1	10,9	9,75	9	.	14,05	0	18,1	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
168	3622	1	1	8	5	1	16,4	16,85	12	14,55	11,05	0	18,3	2	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
169	3507	1	1	8	5	1	15,15	10,85	8	18,15	11,95	0	12,05	1	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
170	3366	1	1	8	4	0	.	19,2	7	.	21,55	1	16,25	2	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
171	711	1	1	8	4	1	22,75	12,1	7	16,65	16,3	1	14,7	1	JACUMA	0	.	0	1	0	1	4
172	1667	1	1	8	6	1	20,15	12,4	8	13,5	11,65	0	15,9	2	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
173	3717	1	1	8	4	0	.	10,75	8	14,9	13,95	1	11,15	1	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
174	1563	1	1	8	4	0	.	11,3	12	.	19,8	1	15,1	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
175	2933	1	1	8	5	0	.	14,3	7	.	17,7	1	13,2	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
176	1821	1	1	8	5	1	17,7	12,75	12	.	17,65	0	19	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1

177	1054	1	1	8	5	1	11,8	11,75	9	.	12,2	0	14,4	1	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
178	3419	1	1	8	5	0	.	10,95	13	.	14,7	1	18,35	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
179	3140	1	1	8	5	1	16,75	8,75	10	.	14,9	0	16,5	2	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
180	679	1	1	8	5	1	22,25	10,85	9	.	11,3	0	17,15	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
181	3363	1	1	8	6	1	20,85	19,9	11	15,95	18,9	0	18,8	2	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
182	1501	1	1	8	6	1	16,1	11,65	7	.	10,75	0	12,8	1	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
183	1627	1	1	8	6	1	14,25	12	12	18,45	13	0	16,95	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
184	3551	1	1	8	5	0	.	14	10	16,8	16,15	1	16,65	2	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
185	3646	1	1	8	6	1	19,4	14,35	5	.	16,85	0	13,3	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
186	2131	1	1	8	5	1	16,6	11,9	10	17,4	14,95	0	10,7	1	PAKAIR	0	.	0	1	.	.	2
187	3408	1	1	8	3	1	16,8	13,75	10	.	10,3	1	15,15	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
188	3583	1	1	8	4	0	.	12,1	6	.	18	1	13,45	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
189	2922	1	1	8	5	0	.	13,25	7	.	17,2	1	19,5	2	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
190	1484	1	1	8	5	1	12,35	14,35	8	20,4	12,35	0	12,95	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
191	1798	1	1	8	5	1	13,35	10,9	17	.	12	0	14,15	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
192	2947	1	1	8	5	1	19,5	12,1	13	18,2	16,5	0	17,2	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
193	1435	1	1	8	6	0	.	11,5	11	.	16,65	0	19,05	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
194	3442	1	1	8	4	0	.	9	8	.	15,3	1	14,45	1	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
195	3382	1	1	8	4	1	21,65	9,05	6	12,25	14,25	1	15,25	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
196	3441	1	1	8	5	1	14,35	10,95	13	.	16,2	0	16,8	2	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
197	3691	1	1	8	5	1	16,75	8,7	14	17,05	14,7	0	11,7	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
198	3586	1	1	8	5	1	14,3	13,3	12	15,35	14,95	0	12,75	1	NEVAL	1	1	1	1	.	.	1
199	2080	1	1	8	5	0	.	14,05	10	.	18,05	1	14,4	1	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
200	3474	1	1	8	5	1	16,65	10,95	8	15,4	16,8	0	13,7	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
201	3628	1	1	8	4	1	10,95	14,3	12	.	15,5	1	13,15	1	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
202	3659	1	1	8	5	0	.	13,15	13	20,55	14,9	1	16,45	2	GURCA	1	1	1	1	.	.	1
203	3503	1	1	8	5	0	.	11,95	6	15,1	14,15	1	16	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
204	2957	1	1	8	4	1	15,75	14,25	10	.	11,7	1	11,8	1	JACUMA	0	.	0	1	1	.	3
205	3447	1	1	8	5	1	22,4	13,9	9	12,05	13,1	0	19,1	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
206	1285	1	1	8	4	1	26,75	16,55	6	.	16,7	1	16,35	2	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
207	3633	1	1	8	3	0	.	16,6	8	19,7	14,05	1	12,15	1	TRUNFO	1	0	0	1	0	1	4
208	3517	1	1	8	5	0	.	9,35	6	.	14,15	1	15,4	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
209	1588	1	1	8	5	1	15,35	14	7	25,4	13	0	13,85	1	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
210	3651	1	1	8	6	1	16,6	11,75	7	18,05	14,5	0	11,5	1	JAMBO	1	1	1	1	.	.	1
211	1764	1	1	8	6	1	19,15	10,7	9	.	13,1	0	18,25	2	JACUMA	0	.	0	1	0	1	4
212	3280	1	1	8	3	0	.	12,05	9	.	12,85	1	15,65	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
213	3170	1	1	8	5	1	15	11,6	10	.	26,2	0	27,25	2	JACUMA	0	.	0	1	.	.	2
214	3314	1	1	8	5	0	.	12,25	8	.	14,55	1	13,2	1	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
215	1793	1	1	8	3	0	.	12,25	8	.	15,25	1	17,95	2	NEVAL	0	.	0	1	0	1	4
216	3010	1	1	7	5	0	.	14,35	15	.	13,55	1	18,25	2	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
217	1027	1	1	7	5	1	22,15	15,1	12	16,55	17,4	0	15,65	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1

218	3518	1	1	7	5	0	.	10,3	8	12,25	13,15	1	11,8	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
219	1853	1	1	7	5	0	.	13,35	12	.	13,05	0	15,95	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
220	2010	1	1	7	5	0	.	8,2	9	.	16,4	1	19,35	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
221	3350	1	1	7	5	1	17,1	16,35	11	.	12,85	0	15,1	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
222	3347	1	1	7	4	1	10,5	12,25	14	14,65	13,85	1	13,3	1	TRUNFO	1	0	0	1	1	.	3
223	3404	1	1	7	4	1	9,25	11,65	16	17,8	9,1	1	14,55	1	PAKAIR	0	.	0	0	0	0	5
224	1765	1	1	7	5	0	.	9,75	6	.	22,2	1	20,6	2	JACUMA	0	.	0	0	0	0	5
225	2983	1	1	7	5	0	.	11,85	8	.	14,9	1	18,75	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
226	3415	1	1	7	5	1	11,25	12,65	8	.	13,15	0	13,2	1	DUENDE	0	.	0	1	.	.	2
227	2935	1	1	7	3	0	.	11,8	8	14,95	15,35	1	17,65	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
228	1979	1	1	7	3	1	15,85	10	10	16,55	14,85	1	14,65	1	GURCA	0	.	0	0	0	0	5
229	3443	1	1	7	5	0	.	15,1	10	.	15,3	1	11,7	1	PAKAIR	1	1	1	1	.	.	1
230	827	1	1	7	5	0	.	15,5	11	.	15,25	1	17,6	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
231	1309	1	1	7	4	0	.	13,5	10	.	16,9	1	19,4	2	JAMBO	1	1	1	1	.	.	1
232	1401	1	1	7	5	1	20,85	16,1	5	23,4	13,3	0	13,8	1	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
233	1995	1	1	7	5	1	18,65	18,7	10	13,1	9,55	0	13,05	1	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
234	1850	1	1	7	5	1	26,05	9,3	9	17,65	12,05	0	14,15	1	LASTRO	1	1	1	1	.	.	1
235	3663	1	1	7	6	0	.	14,65	6	16,3	10,8	0	17,1	2	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
236	1751	1	1	7	6	0	.	10,75	11	.	20,45	0	17,45	2	LASTRO	0	.	0	1	1	.	3
237	3073	1	1	7	5	1	12,45	10,15	17	12,75	11,9	0	15,15	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
238	3525	1	1	7	4	0	.	11,35	6	.	16,55	1	13,05	1	DUENDE	0	.	0	1	.	.	2
239	3252	1	1	7	5	0	.	15,3	9	.	16,6	1	11,65	1	GURCA	1	1	1	1	.	.	1
240	4032	1	1	7	5	1	11,65	10,9	12	.	15,8	0	15,3	2	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
241	3983	1	1	7	5	1	13,95	11,8	12	21,75	9,3	0	13,2	1	TRUNFO	0	.	0	1	.	.	2
242	4158	1	1	7	5	0	.	13,35	15	.	15,6	1	13,2	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
243	4146	1	1	7	5	0	.	9,65	6	.	13,55	1	12,1	1	IMPERIOSO	0	.	0	0	0	0	5
244	3872	1	1	7	5	1	15,1	11,15	8	.	13,95	0	21	2	7522MN	0	.	0	0	0	0	5
245	3886	1	1	7	6	1	10,55	13,35	13	14,7	14,15	0	12,65	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
246	3809	1	1	7	5	1	16,55	13,7	18	.	13,85	0	15,9	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
247	4098	1	1	7	5	1	10,15	11,15	9	.	17,7	0	13,7	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
248	4040	1	1	7	4	1	13,15	11,35	16	.	12,7	1	14,4	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
249	4065	1	1	7	5	0	.	14,3	13	15,85	13,6	1	13,95	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
250	4093	1	1	7	5	1	10,25	11,1	7	17,6	16,55	0	13,4	1	7522MN	1	0	0	0	0	0	5
251	4038	1	1	7	4	0	.	14,3	12	.	12,55	1	18,85	2	7522MN	0	.	0	0	0	0	5
252	4137	1	1	7	4	1	13,25	8,75	7	12,65	10,95	1	10,4	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
253	3782	1	1	7	5	0	.	12,2	17	.	16,7	1	17,3	2	JACUMA	1	1	1	1	.	.	1
254	4169	1	1	7	6	0	.	11,45	9	.	12,1	0	15,25	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
255	4071	1	1	6	4	1	11,65	13,05	9	.	13,8	1	21,1	2	IMPERIOSO	0	.	0	1	.	.	2
256	4154	1	1	7	6	1	11,15	9,85	9	14,8	11,35	0	13,95	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
257	3965	1	1	7	6	1	11,3	9,6	10	.	14,6	0	21,55	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
258	4086	1	1	7	5	0	.	9,65	11	13,75	10,8	1	14,35	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3

259	3888	1	1	7	5	1	10	14,25	11	18,25	13,4	0	13,55	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
260	4135	1	1	7	6	1	10,85	11,7	8	14,05	16,15	0	16,3	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
261	3863	1	1	7	6	0	.	9,5	13	.	14,4	0	20,25	2	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
262	3843	1	1	7	5	1	13,1	12,55	9	14,75	15,65	0	14,45	1	IMPERIOSO	1	1	1	1	.	.	1
263	3819	1	1	7	5	1	13,3	8,65	9	.	11,2	1	14	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
264	3939	1	1	7	5	0	.	14,05	8	.	17,05	1	15,75	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
265	4042	1	1	7	5	1	18,25	9,05	12	.	10,75	0	12,8	1	7522MN	1	1	1	1	.	.	1
266	6135	2	1	9	6	1	19,9	14,15	9	14,55	17	0	17,6	2	MACACAO	1	1	1	1	.	.	1
267	6108	2	1	9	7	0	.	17,1	9	15,4	16,5	0	22,1	2	CIPOAL	1	1	1	1	.	.	1
268	6136	2	1	9	7	1	22,05	9,85	9	19,4	11,95	0	13,9	1	UAI	0	.	0	1	.	.	2
269	6198	2	1	9	8	0	.	12,65	13	19,95	15,45	0	13,65	1	DEQUE	0	.	0	0	0	0	5
270	6111	2	1	9	6	1	23,25	13,9	12	18,15	15,2	0	16,05	2	DEQUE	1	0	0	0	0	0	5
271	6127	2	1	9	8	1	18,5	13,15	10	23,5	23,55	0	27,65	2	MACACAO	0	.	0	1	1	.	3
272	6141	2	1	9	7	1	16,15	11,65	9	14,85	14,3	0	13,4	1	DEQUE	1	1	1	1	.	.	1
273	6067	2	1	9	7	1	25,3	16,05	12	21,05	11,4	0	11,45	1	DEQUE	1	1	1	1	.	.	1
274	6219	2	1	9	7	1	24,6	11,85	10	15,85	17,2	0	17,4	2	CIPOAL	0	.	0	1	0	1	4
275	6119	2	1	9	7	1	16,05	11,1	7	.	15,95	0	13,4	1	CIPOAL	1	1	1	1	.	.	1
276	6146	2	1	9	7	1	22,85	15,8	9	20,8	15,7	0	18,8	2	MACACAO	0	.	0	1	1	.	3
277	6117	2	1	9	6	0	.	15,75	7	17,1	11,8	0	11,75	1	MACACAO	0	.	0	1	0	1	4
278	6093	2	1	9	7	1	19,85	9,75	8	16,55	14,9	0	15,15	2	CIPOAL	1	1	1	1	.	.	1
279	6179	2	1	9	7	1	17	10,1	7	19,25	10,5	0	12,05	1	MACACAO	1	1	1	1	.	.	1
280	6035	2	1	9	6	1	15,1	9,95	9	20,2	14,75	0	14,25	1	CIPOAL	1	1	1	1	.	.	1
281	6151	2	1	9	6	1	19,05	12,85	6	16,25	13,95	0	17,1	2	CIPOAL	1	1	1	1	.	.	1
282	6197	2	1	9	7	1	17,95	16,1	9	20,35	15,05	0	12,4	1	DEQUE	0	.	0	1	.	.	2
283	6173	2	1	9	6	1	24,8	15,8	12	18,05	15,65	0	17,25	2	UAI	1	1	1	1	.	.	1
284	6207	2	1	9	6	1	21,5	14,05	7	19,15	14,5	0	13,2	1	DEQUE	0	.	0	0	0	0	5
285	6214	2	1	9	6	1	15,4	12,6	16	.	17,2	0	14,25	1	MACACAO	1	0	0	1	0	1	4
286	273	1	2	1314	5	1	20,1	8,05	6	19,5	10,5	0	13,2	1	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
287	286	1	2	1314	5	1	10,85	6,3	9	.	14,4	0	15,65	2	PACAIR	0	.	0	1	0	1	4
288	628	1	2	1314	5	0	.	6,85	16	.	19,3	1	16,35	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
289	886	1	2	1314	5	0	.	14,5	7	.	17,6	0	13,6	1	DUENDE	0	.	0	0	0	0	5
290	894	1	2	1314	7	1	19,7	9,88	8	15,35	16,95	0	17,15	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
291	1053	1	2	1314	6	1	14,7	13,1	6	.	15,3	0	17,6	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
292	1376	1	2	1314	5	0	.	14,3	9	19,4	13	1	13,1	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
293	1413	1	2	1314	5	1	16,7	11,3	9	15,15	14,7	0	15,1	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
294	1418	1	2	1314	6	1	13,65	7,6	10	15	13,3	0	16,05	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
295	1422	1	2	1314	5	1	19,05	17,75	8	19,65	16,8	1	20,1	2	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
296	1458	1	2	1314	6	0	.	14,35	8	13,5	9,55	0	11,6	1	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
297	1476	1	2	1314	5	0	.	36,05	10	16,35	15,15	0	17,25	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
298	1486	1	2	1314	7	1	18,35	9,55	9	19	11,4	0	11,05	1	PACAIR	0	.	0	1	0	1	4
299	1491	1	2	1314	6	1	17,65	14,7	10	18,8	15,1	0	12,25	1	DUENDE	0	.	0	1	0	1	4

300	1496	1	2	1314	5	0	.	11	8	19	11,6	1	13,55	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
301	1497	1	2	1314	5	0	.	14,65	13	.	14,1	1	15,25	2	TRUNFO	0	.	0	1	0	1	4
302	1508	1	2	1314	4	1	25,15	9,9	14	.	20,55	1	15,8	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
303	1716	1	2	1314	4	1	15,2	8,5	9	18,7	10,25	1	10,85	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
304	1833	1	2	1314	5	0	.	17,75	7	16,15	14,5	0	15,5	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
305	1872	1	2	1314	6	0	.	12,8	4	.	8,95	0	15,95	2	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
306	1890	1	2	1314	5	1	17,6	11,2	10	16,75	12,9	0	16,8	2	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
307	1904	1	2	1314	5	1	15,05	11,35	6	19,95	14,3	1	11,85	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
308	1920	1	2	1314	5	1	12,45	9,85	13	17,65	20,05	0	18,1	2	DUENDE	1	0	0	1	1	.	3
309	1937	1	2	1314	4	1	27,9	9,75	7	.	16,5	0	18,55	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
310	2105	1	2	1314	5	1	12,75	15	4	15	15,15	0	14,05	1	TRUNFO	0	.	0	0	0	0	5
311	2108	1	2	1314	6	1	21,9	13,45	6	.	17,9	0	18,15	2	JAMBO	1	0	0	1	1	.	3
312	2909	1	2	1314	6	1	21,9	13,1	4	14,55	11,65	0	15,05	1	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
313	2924	1	2	1314	5	1	14,95	11,15	13	13,15	15,3	0	17,35	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
314	2960	1	2	1314	5	1	20,85	10,15	16	.	12,4	0	18,85	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
315	2982	1	2	1314	5	1	9,485	7,15	14	13,05	14,95	0	15,2	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
316	3001	1	2	1314	5	0	.	14,05	10	.	14,4	0	16,8	2	JAMBO	1	0	0	0	0	0	5
317	3042	1	2	1314	7	1	16,9	10,75	9	12,7	15,35	0	14,35	1	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
318	3045	1	2	1314	6	1	13,45	10,3	7	17,3	14,95	0	15,55	2	PACAIR	0	.	0	1	0	1	4
319	3055	1	2	1314	5	1	9,35	9	7	.	14	0	11,1	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
320	3056	1	2	1314	4	1	23,95	11,05	8	17,65	16,15	0	14,25	1	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
321	3083	1	2	1314	4	0	.	11,85	6	20,8	11,1	1	15,3	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
322	3185	1	2	1314	5	0	.	11,8	4	14,85	15,8	0	12,15	1	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
323	3238	1	2	1314	5	0	.	14,25	13	19,6	15,9	0	13,7	1	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
324	3253	1	2	1314	6	0	.	8,5	13	15,65	14,6	0	17,5	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
325	3259	1	2	1314	5	1	13,55	8,75	16	.	10,2	0	12,65	1	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
326	3274	1	2	1314	5	1	24,05	10,2	9	15,4	13,3	0	17,25	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
327	3374	1	2	1314	5	1	12,55	6,85	8	21,05	11	0	12,1	1	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
328	3392	1	2	1314	4	1	19,4	10,75	8	13,8	19,55	1	19,15	2	TRUNFO	1	0	0	0	0	0	5
329	3466	1	2	1314	4	0	.	7,65	6	.	9,2	1	17,25	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
330	3495	1	2	1314	5	1	20,55	10,45	6	.	15,9	0	15,75	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
331	3577	1	2	1314	6	0	.	14,25	4	13,85	13,05	0	10,35	1	TRUNFO	0	.	0	1	1	.	3
332	3582	1	2	1314	4	0	.	15,65	9	.	15,05	1	15,3	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
333	3630	1	2	1314	6	0	.	14,95	16	.	17,1	0	17,3	2	DUENDE	0	.	0	0	0	0	5
334	3635	1	2	1314	5	1	16,15	10,85	9	.	16,95	0	20,95	2	TRUNFO	1	1	1	1	.	.	1
335	3660	1	2	1314	4	0	.	14,9	16	.	16,9	1	20,1	2	PACAIR	0	.	0	1	0	1	4
336	3678	1	2	1314	5	0	.	12,45	9	.	12,45	0	13,6	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
337	3682	1	2	1314	4	1	12,85	10,45	10	15,3	12,7	0	12,65	1	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
338	3786	1	2	1314	6	1	14,25	14,05	4	15,4	19,85	0	11,35	1	DUENDE	0	.	0	0	0	0	5
339	3812	1	2	1314	5	0	.	13	9	.	15,75	1	17,25	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
340	3824	1	2	1314	5	1	10,6	6,3	4	.	15,35	0	14,25	1	JAMBO	0	.	0	1	0	1	4

341	3846	1	2	1314	5	0	.	8,75	8	.	10,9	1	14,65	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
342	3879	1	2	1314	7	0	.	12,75	16	10,25	14,3	0	13,8	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
343	3912	1	2	1314	5	0	.	13,5	10	.	19,05	1	22,25	2	DUENDE	1	1	1	1	.	.	1
344	3913	1	2	1314	5	1	13,7	14,4	7	.	17,3	0	15,4	2	PACAIR	1	1	1	1	.	.	1
345	3969	1	2	1314	6	0	.	12,9	14	16,35	16,1	0	10,75	1	PACAIR	0	.	0	0	0	0	5
346	3981	1	2	1314	5	1	6,3	14,25	16	.	15,5	1	18,45	2	PACAIR	1	0	0	0	0	0	5
347	4041	1	2	1314	6	0	.	11,35	8	12,7	14,55	0	15,3	2	DUENDE	0	.	0	0	0	0	5
348	4063	1	2	1314	5	0	.	10,75	6	12	7,55	1	12,35	1	JAMBO	0	.	0	0	0	0	5
349	4081	1	2	1314	6	0	.	12,4	14	.	14,65	0	12,95	1	PACAIR	0	.	0	1	0	1	4
350	4132	1	2	1314	5	0	.	11,2	7	.	16,35	0	10,65	1	JAMBO	1	1	1	1	.	.	1
351	123	2	2	1314	7	0	.	16,45	16	.	12,85	0	14,1	1	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1
352	130	2	2	1314	6	1	14,85	15,15	13	26,3	13,25	0	12,7	1	TOTEM	0	.	0	1	1	.	3
353	154	2	2	1314	7	1	14,35	12,5	8	14,25	10,25	0	14,15	1	TOTEM	0	.	0	0	0	0	5
354	3865	2	2	1314	7	0	.	14,8	9	.	20,75	0	20,75	2	TOTEM	0	.	0	0	0	0	5
355	3875	2	2	1314	6	0	.	13,4	9	16,25	10,8	0	13,3	1	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1
356	4066	2	2	1314	7	0	.	12,5	8	16,45	13,8	0	17,05	2	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1
357	4122	2	2	1314	7	0	.	15,45	6	11,4	13,3	0	17,4	2	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1
358	5759	2	2	1314	6	0	.	12,15	12	18,2	11,9	0	11,9	1	MACACÃO	0	.	0	1	1	.	3
359	5766	2	2	1314	7	0	.	15,8	6	12,05	20,8	0	15,1	2	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
360	5782	2	2	1314	6	1	25,05	12,1	16	20,5	10,9	0	10,95	1	MACACÃO	0	.	0	0	0	0	5
361	5804	2	2	1314	6	1	25,7	18	9	.	20,05	0	19	2	TOTEM	1	0	0	0	0	0	5
362	5806	2	2	1314	7	1	20,15	16,2	8	15,9	12,75	0	15,7	2	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
363	5854	2	2	1314	6	0	.	13,55	9	25,05	12,65	0	13,35	1	MACACÃO	0	.	0	0	0	0	5
364	5857	2	2	1314	7	0	.	14,2	6	19,8	14,3	0	13,2	1	MACACÃO	0	.	0	1	1	.	3
365	5867	2	2	1314	8	0	.	18,65	10	19,15	14,9	0	15,7	2	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
366	5870	2	2	1314	7	1	18,1	14,3	6	14,05	15,15	0	14,5	1	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
367	5878	2	2	1314	6	1	14,05	9,65	9	11,85	14,9	0	11,3	1	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
368	5886	2	2	1314	8	1	22,6	13,9	10	.	17,55	0	14,95	1	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
369	5912	2	2	1314	7	1	21,5	13,55	7	.	19,85	0	19,65	2	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
370	5932	2	2	1314	6	1	13,1	12,9	4	21,2	12,25	0	11,1	1	MACACÃO	0	.	0	0	0	0	5
371	5942	2	2	1314	6	0	.	15,85	15	16,85	11,65	0	12,55	1	TOTEM	0	.	0	0	0	0	5
372	5953	2	2	1314	6	0	.	17,45	9	.	17,1	0	17,4	2	TOTEM	0	.	0	0	0	0	5
373	5963	2	2	1314	8	1	13,75	11,5	13	26,15	14,05	0	14,65	1	TOTEM	0	.	0	0	0	0	5
374	6029	2	2	1314	7	1	21,3	13,2	16	17,75	20,1	0	21,3	2	MACACÃO	1	1	1	1	.	.	1
375	6101	2	2	1314	6	0	.	12	12	21,6	10,95	0	12,45	1	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1
376	6144	2	2	1314	5	0	.	15,6	8	.	14,7	0	14,5	1	TOTEM	1	1	1	1	.	.	1