

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**A INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
NUMA VACARIA DE LEITE DE ALTA PRODUÇÃO**

JOÃO GABRIEL BARATA DOS PRAZERES

ORIENTADOR:

Dr. João Pedro Trolha Medalhas

COORIENTADOR:

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**A INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
NUMA VACARIA DE LEITE DE ALTA PRODUÇÃO**

JOÃO GABRIEL BARATA DOS PRAZERES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE: Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

VOGAIS:

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres
Doutor João Nestor Chagas e Silva

ORIENTADOR:

Dr. João Pedro Trolha Medalhas

COORIENTADOR:

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2023

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: João Gabriel Barata dos Prazeres

Título da Tese ou Dissertação: A influência de alguns fatores na eficácia da inseminação artificial numa vacaria de leite de alta produção

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

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

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

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

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

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

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

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

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

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

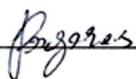
* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

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

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

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 30 de outubro de 2023

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: 

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Doutor João Nestor das Chagas e Silva, por todo o apoio e orientação que me deu, não só durante a elaboração desta dissertação, mas nos últimos quatro anos do meu percurso académico. Obrigado pela possibilidade de o poder acompanhar nas suas saídas de campo, pelo treino de laboratório, treino de inseminação artificial e muitas outras atividades que permitiram que eu obtivesse novos conhecimentos e os colocasse em prática, aumentando assim as minhas capacidades e confiança.

Um agradecimento ao Dr. João Pedro Trolha Medalhas, por me ter recebido e orientado durante o estágio curricular, permitindo efetivar muito do conhecimento obtido ao longo do curso.

Deixo ainda um agradecimento ao Eng. Luís Gomes e a toda a equipa da Joergen Thymm, Lda. por me terem acolhido durante o estágio curricular, sempre com boa disposição de espírito, vontade de me ajudar no que fosse necessário. Obrigado por me ensinarem um pouco da realidade que é ter e gerir uma vacaria de leite.

Agradeço também aos meus amigos dentro e fora do curso que partilharam comigo momentos de alegria e boa disposição que fazem parte da vida universitária, mas também os momentos menos bons, quando me deram o apoio necessário para poder continuar em frente.

Um grande agradecimento à minha família, principalmente aos meus pais por serem uma base de amor incomparável, pois sem eles nada disto teria sido possível. Agradeço todo o apoio e esforço que fizeram para que eu pudesse entrar e completar o curso com que sempre sonhei, sempre me motivando para fazer o melhor e alcançar os meus objetivos.

Agradecer por fim à minha namorada Mariana por toda a ajuda e apoio que me deu durante a elaboração desta dissertação, por ter sido sempre uma voz calma que me reconfortou em situações de maior stress, por sempre querer o melhor para mim e por ser a maior motivadora para que eu escrevesse esta dissertação.

A influência de alguns fatores na eficácia da inseminação artificial numa vacaria de leite de alta produção

Resumo

Para que uma exploração consiga atingir sucesso, um dos fatores que não pode ser desprezado é o manejo reprodutivo. Assim, o produtor deve assegurar que dispõe das melhores ferramentas e conhecimentos para que todos os seus animais consigam alcançar a melhor *performance* reprodutiva possível.

Assim, esta dissertação tem com objetivo o estudo de fatores que influenciam o sucesso da inseminação artificial (IA) numa vacaria leiteira de alta produção. Para tal, este trabalho consiste em dois estudos observacionais retrospectivos: uma delas focada em vacas e a segunda, em novilhas. No estudo com as vacas, os fatores estudados foram o inseminador, o touro dador do sêmen, a ocorrência ou não de um puerpério saudável, o intervalo de tempo entre o parto e a primeira inseminação, a condição corporal antes do início do protocolo hormonal e o número de partos de cada vaca. No estudo envolvendo as novilhas, os fatores avaliados foram a idade das novilhas, o inseminador, o macho dador do sêmen e a utilização ou não de um protocolo hormonal de indução/sincronização da ovulação.

Como resultados obtidos no estudo das vacas, concluiu-se que, em termos estatísticos, o número de partos de cada vaca, o touro dador do sêmen e o inseminador revelaram influência significativa no resultado da IA. Verificou-se que a probabilidade de a vaca ficar gestante diminuiu nas vacas múltíparas, relativamente às primíparas e que, registaram-se variações significativas nos resultados obtidos por cada inseminador e por cada touro. Apesar de os outros parâmetros não terem tido significância estatística relativamente à taxa de gestação, fatores como a ocorrência ou não de um puerpério saudável e a condição corporal antes do início do protocolo hormonal, observaram-se resultados dignos de serem discutidos. Por fim, no estudo com as novilhas não foram encontradas relações estatisticamente significativas nas relações estudadas, contudo foi na mesma possível retirar certas conclusões das relações estudadas. Na análise comparativa entre as que foram sujeitas a um protocolo hormonal de sincronização e as inseminadas após detecção de cio natural, registou-se uma quebra da fertilidade das primeiras comparativamente às segundas e, mais uma vez, foram identificadas diferenças na taxa de sucesso da IA de cada inseminador e do touro dador do sêmen.

Palavras-chave: Fatores, Inseminação Artificial, Novilha, Vaca.

The influence of some factors on the effectiveness of artificial insemination in a high-production dairy herd

Abstract

In order for a farm to achieve success, one of the factors that cannot be overlooked is reproductive management. Therefore, the producer must ensure that they have the best tools and knowledge to ensure that all their animals can achieve the best possible reproductive performance.

Thus, the objective of this dissertation is to study the factors that influence the success of artificial insemination (AI) in a high-production dairy herd. To do this, this work consists of two retrospective observational studies: one focused on cows and the second on heifers. In the study with cows, the factors studied were the inseminator, the bull providing the semen, the occurrence or not of a healthy postpartum period, the time interval between calving and the first insemination, the body condition before the start of the hormonal protocol, and the number of calvings for each cow. In the study involving heifers, the evaluated factors were the age of the heifers, the inseminator, the male donor of semen, and the use or not of a hormonal protocol for ovulation induction/synchronization.

As for the results obtained in the study of cows, it was concluded that, statistically, the number of calvings for each cow, the bull providing the semen, and the inseminator showed a significant influence on the outcome of AI. It was found that the probability of a cow becoming pregnant decreased in multiparous cows compared to primiparous ones, and significant variations were observed in the results obtained by each inseminator and each bull. Although the other parameters did not have statistical significance regarding the pregnancy rate, factors such as the occurrence or not of a healthy postpartum period and the body condition before the start of the hormonal protocol showed results worthy of discussion. Finally, in the study with heifers, statistically significant relationships were not found in the studied relationships; however, it was still possible to draw certain conclusions from the relationships studied. In the comparative analysis between those subjected to a hormonal synchronization protocol and those inseminated after natural estrus detection, a decrease in fertility of the former compared to the latter was observed, and once again, differences in the success rate of AI were identified for each inseminator and the bull providing the semen.

Key-words: Factors, Artificial Insemination, Heifers, Cows.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de tabelas	viii
Índice de gráficos.....	ix
Índice de esquemas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
2.Relatório de estágio.....	1
3. Revisão da literatura.....	2
3.1. Maneio reprodutivo de uma exploração leiteira de alta produção.....	2
3.1.1 Maneio da fertilidade	2
3.1.1.1 Início do trabalho reprodutivo nas novilhas.....	3
3.1.1.1.1. Período pré-púbere e puberdade	3
3.1.1.1.2. Maturidade sexual.....	5
3.1.1.2. Beneficiação e diagnóstico de gestação	6
3.1.1.3. Pré-parto e parto.....	9
3.1.1.4. Intervalo entre partos.....	10
3.1.1.4.1. Anestro pós-parto	11
3.1.1.4.1.1. Nutrição.....	11
3.1.1.4.1.2. Patologias do período puerperal	12
3.1.1.4.1.3. Produção Leiteira.....	14
3.1.1.4.2. Reinício da atividade cíclica.....	14
3.1.3. Condição corporal e a atividade reprodutiva.....	15
3.2. Fundamentos teóricos sobre a indução/sincronização da ovulação.....	16
3.2.1. Protocolos de indução/sincronização da ovulação.....	19
3.2.1.1. Ovsynch e pré-sincronização	19
3.2.1.2. Co-Sincronização (Co-Synch)	22
3.3. Eficácia da inseminação artificial.....	23
3.3.1. A inseminação artificial.....	23
3.3.1.1. A técnica	24
3.3.1.2. O inseminador.....	25
3.3.1.3. O sémen utilizado	26
3.3.1.3.1. Touro.....	27
3.3.1.3.2. Sémen convencional	28
3.3.1.3.3. Sémen sexado	28
3.3.2. Fatores condicionadores ligados à fêmea.....	31
3.3.2.1. Número de partos	31

3.3.2.2. Intervalo pós-parto.....	32
3.3.3. A IA e a deteção do cio	33
4. Trabalho Experimental	34
4.1. Introdução.....	34
4.2. Material e Métodos	34
4.2.1. Recolha dos dados e dimensão da amostra	34
4.2.2. Caracterização da exploração	37
4.2.3. Maneio reprodutivo	38
4.2.4. Análise estatística.....	39
5. Resultados e discussão	40
5.1. Estudo realizado com as vacas.....	40
5.2. Estudo realizado com as novilhas.....	45
6. Conclusão.....	48
7. Bibliografia.....	50

Índice de tabelas

Tabela 1: Taxa de concepção em função da hora de realização da IA, após a última injeção de GnRH, do protocolo “Ovsynch” (Pursley et al. 1998).....	20
Tabela 2: Frequência e percentagem de vacas por cada classe de número de partos	36
Tabela 3: Frequência e percentagem de animais observados em cada classe de condição corporal.....	36

Índice de gráficos

Gráfico 1: Resultados dos diagnósticos de gestação obtidos por classe de CC	40
Gráfico 2: Resultados dos diagnósticos de gestação obtidos por classe de número de partos	42

Índice de esquemas

Esquema 1: Protocolo de sincronização Double Ovsynch utilizado nas vacas39

Lista de abreviaturas

% – Por cento

AgRP – Peptídeo relacionado com o agouti

BEN – Balanço energético negativo

BLV – Vírus da leucose bovina

BVD – Vírus da diarreia bovina

CC – Condição corporal

CIDR – Dispositivo intravaginal de libertação controlada do fármaco

Cl – Corpo lúteo

E₂ – Estradiol

EPF – Fator de gestação precoce

FSH – Hormona folículo-estimulante

g – Gramas

GH – Hormona do crescimento

GnRH – Gonadoliberina

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial a tempo fixo

IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina

IGF-1 – Fator de crescimento insulínico tipo-1

IPVD – Dispositivo intravaginal de progesterona Cue-Mate

kg – Quilograma

LH – Hormona luteinizante

LPS – Lipopolissacarídeos bacterianos

mL – Mililitro

NEFAS – Ácidos gordos não esterificados

ng – Nanograma

NPY – Neuropeptido Y

P₄ – Progesterona

PAGs – Glicoproteínas associadas à gestação

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF_{2α} – Prostaglandina F₂alfa

PI – Persistentemente infetada

PMN – Neutrófilos polimorfonucleares

POMC – Propiomelanocortina

PRID – Dispositivo intravaginal de libertação de progesterona

α-MSH – Hormona estimuladora dos melanócitos tipo α

µg – Micrograma

1.Introdução

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado Integrado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, tendo sido os dados necessários para a sua elaboração obtidos e recolhidos durante o estágio curricular realizado.

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo de fatores que influenciam o sucesso da inseminação artificial (IA) numa vacaria leiteira de alta produção. Esta dissertação encontra-se dividida EM dois estudos observacionais retrospectivos – o primeiro aborda fatores que influenciam o sucesso da inseminação artificial em vacas de leite, nomeadamente o inseminador, o touro dador do sémen, a ocorrência ou não de um puerpério saudável, o intervalo de tempo entre o parto e a primeira IA, a condição corporal antes do início do protocolo hormonal de indução/sincronização da ovulação e o número de partos de cada vaca. O segundo estudo trabalhou os fatores que influenciam o sucesso da IA em novilhas de leite, sendo os fatores estudados a idade das novilhas, o inseminador, o touro dador do sémen e a utilização ou não de um protocolo hormonal indução/sincronização da ovulação.

Após esta introdução, segue-se o relatório das atividades acompanhadas/realizadas durante o estágio curricular. No que toca ao trabalho experimental, ele faz suporte inicial de uma revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento e maturação sexual nos bovinos, referindo alguns fatores que podem influenciar a fertilidade de bovinos de leite mencionados na literatura relevante sobre a matéria. Após a contextualização bibliográfica, são apresentados os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho. Em seguida, são expostos os resultados obtidos, bem como a discussão e considerações acerca dos mesmos. Por fim, são apresentadas as conclusões do trabalho onde se expõem os resultados mais relevantes, bem como as limitações encontradas, possibilidades de investigação futura e as respetivas considerações finais.

2.Relatório de estágio

O estágio foi realizado na Herdade Vale de Cardeiros (J.Thymm, Lda.), localizada na freguesia de Seda, concelho de Alter do Chão, pertencente ao distrito de Portalegre, no período compreendido entre 1 de Outubro de 2022 e dia 25 de Fevereiro de 2023, perfazendo um total de quinhentas horas. O estágio foi orientado pelo Dr. João Pedro Trolha Medalhas, com a coorientação do Doutor João Nestor das Chagas e Silva.

Neste período de tempo foi possível observar e acompanhar o funcionamento de uma vacaria de leite de alta produção e compreender o papel ativo e fundamental do veterinário para o sucesso de uma empresa deste tipo. Algumas das tarefas desempenhadas neste local passaram pela participação na ordenha e nos testes de

contraste leiteiro, vacinação, desparasitação e descorna de animais, recolha e envio de material para testagem genética de novilhas e participação no maneio reprodutivo da vacaria, mais especificamente através da realização de exames ginecológicos, diagnóstico de gestação por palpação transretal e com apoio ecográfico e aplicação de protocolos hormonais para indução/sincronização da ovulação. Foi ainda possível realizar a cateterização de vacas como forma de treino para o procedimento de IA e proceder ao diagnóstico e tratamento de patologias como cetose, hipocalcémia, metrite e endometrite clínica.

De forma a complementar as atividades realizadas na vacaria, foi ainda possível acompanhar o Dr. João Pedro Trolha Medalhas, na prestação de serviços médico-veterinários a outras explorações, sendo na sua maioria vacarias de carne e explorações de ovinos e caprinos. Nestas prestações de serviço, foi possível realizar tarefas relacionadas com a profilaxia e a sanidade dos animais, estando incluídas as provas de intradermotuberculização comparada e a recolha de sangue para o despiste de Brucelose. Além disso, beneficiou-se da possibilidade de acompanhar os exames andrológicos em bovinos de carne e a colaborar no auxílio a um parto distócico, na remoção de um corno a um touro de carne e num diagnóstico de hipomagnesiémia num efetivo ovino.

3. Revisão da literatura

3.1. Maneio reprodutivo de uma exploração leiteira de alta produção

3.1.1 Maneio da fertilidade

O sucesso de uma exploração leiteira está intimamente interligado à eficácia do maneio reprodutivo dessa mesma exploração (Cardoso Consentini et al. 2021). Assim, uma exploração tem de optar por estratégias que resultem na obtenção de animais com bons índices produtivos e que também se destaquem a nível reprodutivo, de forma a ser conseguida a melhor rentabilidade possível. Contudo, no passado, esta relação não era tão evidente para o produtor, que colocou a performance reprodutiva em segundo plano em comparação com o nível produtivo, o que conduziu a uma seleção de animais para uma maior produção leiteira em detrimento de outras características importantes, resultando num decréscimo significativo da eficácia reprodutiva (Lucy 2001; Weigel et al. 2017). Nos dias de hoje, com o avanço das tecnologias reprodutivas e o recurso aos testes genómicos, pode ser conseguida uma melhor seleção dos animais a explorar, sendo possível selecionar para as características mais desejáveis para o produtor, tendo em consideração o grau de heritabilidade das mesmas (García-Ruiz et al. 2016).

De um ponto de vista económico, segundo um estudo realizado em 2010, 88% das receitas geradas por uma exploração leiteira devem-se à venda do leite produzido e, aproximadamente 12%, resultam da venda de animais (Santos et al. 2010). Tendo em conta que estas duas fontes de receita estão intimamente ligadas à eficiência reprodutiva, percebemos assim a importância da eficácia do manejo reprodutivo para a manutenção de uma situação financeira favorável na exploração. Assim sendo, ao investir de forma correta em estratégias de manejo reprodutivo, o produtor conseguirá recuperar o seu investimento mais facilmente ao aumentar os seus lucros através do aumento das vendas de leite e do valor pelo qual os seus animais são vendidos. Além do mais, irá reduzir os custos ligados à obtenção de animais de substituição e melhorar o aproveitamento de materiais e consumíveis ligados ao processo de manejo reprodutivo (Ribeiro et al. 2012; Cabrera 2014).

3.1.1.1 Início do trabalho reprodutivo nas novilhas

De forma a alcançar a maturidade sexual e iniciar a sua vida reprodutiva, as fêmeas devem sofrer uma evolução que consiste na maturação do seu sistema reprodutivo e dos órgãos envolvidos na regulação hormonal da reprodução, de forma a garantir que apresentam as condições físicas e fisiológicas, necessárias para completar com sucesso, todas as etapas até ao parto.

3.1.1.1.1. Período pré-púbere e puberdade

Uma fêmea atinge a puberdade quando tem uma ovulação acompanhada de comportamento de cio, seguida de uma fase lútea de duração normal (Atkins et al. 2013). Na maioria dos casos, a puberdade não coincide com a primeira ovulação. Por norma, as ovulações anteriores ao estabelecimento da puberdade não têm uma fase lútea normal, devido à produção de Prostaglandina F₂alfa (PGF_{2α}) libertada pelo endométrio. Isto acontece porque, naquele momento, o endométrio tem uma grande concentração de recetores de oxitocina e, uma redução da sensibilidade desses recetores apenas acontece com uma exposição mais prolongada à progesterona (P₄) (Hunter 1991) Assim, a ovulação que estabelece o início da puberdade pode ser comprovada por mensurações sucessivas dos níveis de P₄ superiores a 1 ng/mL. Contudo, há que ter em consideração a existência de diversos fatores que influenciam o momento em que este evento ocorre, incluindo a raça, a nutrição, a estação do ano e o manejo geral da exploração.

Durante a fase pré-púbere existe uma libertação de baixa frequência da gonadoliberina (GnRH) pelo hipotálamo, aumentando de frequência ao longo do tempo. O aumento desta hormona irá gerar uma elevação da frequência pulsátil da hormona

luteinizante (LH) por parte da adeno-hipófise, o que conduzirá, por fim, à ovulação de um folículo pré-ovulatório.

Neste período, verifica-se um “feedback” negativo exercido sobre a LH por parte do estradiol folicular. Porém, à medida que a fêmea se aproxima da puberdade, a influência deste “feedback” vai sendo cada vez menor (Day et al. 1984). A redução deste “feedback” deve-se a uma redução de recetores para o estradiol no hipotálamo, o que leva a um aumento da libertação pulsátil de LH, cerca de 50 dias antes da puberdade. Esta sequência de eventos irá permitir que haja um “feedback” positivo entre a libertação de LH e a produção de estradiol, aumentando esta última o que leva à maturação e crescimento uterinos e, por fim, à ocorrência do pico pré ovulatório de LH (Day et al. 1987).

Porém, a produção de GnRH já ocorre bastante antes daquele intervalo de 50 dias que precede a puberdade, sendo que a libertação desta hormona é positivamente afetada pela kisspeptina (Cardoso et al. 2020) Este neuropéptido encontra-se num conjunto de neurónios denominados de KNDy, localizados no hipotálamo e ligados aos neurónios responsáveis pela libertação da GnRH. Os neurónios KNDy produzem três tipos de péptidos diferentes – kisspeptina, neurokinina B e dynorphina – que se controlam mutuamente através de sistemas de “feedback”. A neurokinina B vai estimular a libertação da kisspeptina e, com a ativação do neurónio, irá ocorrer uma libertação da dynorphina, levando por sua vez à inibição da libertação da kisspeptina (Lehman et al. 2010). Um trabalho realizado em 2008 com novilhas Holstein pré-púberes, demonstrou que a administração endovenosa de kisspeptina induziu um aumento significativo da concentração de LH e GnRH plasmáticas (Kadokawa et al. 2008), fundamentando a importância do papel daquele elemento no período pré-púbere. Diversos estudos realizados noutros mamíferos, como ratos (Kirilov et al. 2013) e ovelhas (Redmond et al. 2011), demonstraram a importância deste mensageiro na libertação da GnRH e da LH, para que os animais atingissem a puberdade levando á ativação e estimulação do eixo hipotálamo-hipofisário (Redmond et al. 2011), e por demonstrar que os mesmos a não atingiam a puberdade, com a deleção dos recetores para a kisspeptina (Kirilov et al. 2013).

Outro elemento importante para o correto funcionamento do sistema endócrino é o estado metabólico da novilha, fortemente influenciado pelo aporte alimentar. Substâncias como a insulina, a leptina e o fator de crescimento insulínico tipo-1 (IGF-1) promovem um feedback positivo sobre os neurónios libertadores de GnRH (Williams et al. 2018). Entre eles, a leptina é aquela que demonstra ter um papel de maior relevância, tendo a capacidade de modular a resposta hormonal ao nível do hipotálamo através do controlo da libertação do neuropéptido Y (NPY), da proopiomelanocortina (POMC) e do

peptídeo relacionado com o agouti (AgRP). A libertação de GnRH vai ser inibida pelo NPY e pelo AgRP, e estimulada pelo POMC (Cardoso et al. 2020). Esta estimulação é feita diretamente nos neurónios libertadores da GnRH pela hormona estimuladora dos melanócitos tipo α (α -MSH) que tem como o precursor a POMC (Roa and Herbison 2012). Alguns estudos, realizados com outras espécies, comprovaram que a leptina consegue regular a expressão da kisspeptina, por existir uma comunicação entre as células da mesma e as das NPY e POMC, modulando assim, tanto a resposta reprodutiva como a metabólica (Backholer et al. 2010; Ronnekleiv et al. 2019). Visto que a leptina é uma hormona metabólica produzida nos adipócitos, o regime alimentar das novilhas é bastante importante para alcançar a puberdade. Em 2014, foi realizado um estudo entre dois grupos de novilhas, em que um deles foi sujeito a uma dieta rica em concentrado que promovia um aumento de 1 kg/dia de peso corporal, enquanto que o segundo grupo consumiu uma dieta que aumentou o peso corporal em 0,5 kg/dia, concluindo-se que o grupo alimentado com a dieta que promovia um maior aumento do peso corporal por dia alcançou a puberdade mais precocemente (Cardoso et al. 2014).

Durante estes dois períodos da vida de uma novilha, a hormona folículo-estimulante (FSH) mantém-se em níveis relativamente constantes, o que demonstra que não é um elemento determinante no desencadear da puberdade (Gonzalez-Padilla et al. 1975). Estes autores demonstraram igualmente que a P_4 , apesar de existir em baixas concentrações, apresenta dois picos no período pré-púbere que antecedem o pico pré-ovulatório de LH, o que comprovou a influência daquela hormona no desencadeamento do processo que leva à primeira ovulação.

Durante estes períodos ocorre também o desenvolvimento do útero e dos ovários. O útero tem um desenvolvimento bifásico, aumentando de forma bastante acelerada nas primeiras semanas de vida, sendo o processo de crescimento gradualmente mais lento até atingir um plateau por volta das 24 semanas de idade e, posteriormente, retomado perto das 32 semanas até às 60 semanas de idade. O desenvolvimento do útero está assim correlacionado com o aumento dos níveis de estradiol (E_2) que é produzido pelos folículos que se desenvolvem no ovário, que revelam igualmente, um crescimento bifásico (Honaramooz et al. 2004).

3.1.1.1.2. Maturidade sexual

Após a ovulação que estabelece a puberdade nas novilhas, estas fêmeas apesar de já serem capazes de se reproduzirem, não estão capacitadas para assegurar uma gestação até termo, com o mesmo nível de sucesso, que outras novilhas mais velhas. As novilhas de diferentes raças atingem a puberdade entre os 55 a 60% do peso corporal de uma vaca adulta da sua raça. Porém, de forma a assegurar que têm a

estrutura física adequada para conseguirem manter uma gestação, deverão atingir um patamar de 65% do peso corporal da vaca adulta, para que no final da gestação alcancem os 85%, permitindo assim um parto mais fácil (Estill 2021). Para além disto, a qualidade do óócito gerado nas primeiras ovulações não é tão boa, quanto os de uma novilha mais velha. Tal facto foi comprovado num trabalho experimental que comparou as taxas de conceção de novilhas que foram inseminadas no seu primeiro ciclo de puberdade e, outras no seu terceiro ciclo, tendo sido registado um aumento de 21% da taxa de gestação do primeiro para o terceiro ciclo (Byerley et al. 1987).

3.1.1.2. Beneficiação e diagnóstico de gestação

Após uma avaliação realizada pelo médico veterinário, que vai assegurar que as fêmeas examinadas revelam as condições necessárias para serem inseminadas com sucesso, levarem uma gestação até termo, vindo a parir sem problemas, elas poderão ser beneficiadas. Após esta, torna-se necessário averiguar se houve ou não sucesso. Para tal, é fundamental o diagnóstico de gestação. Numa vacaria, é muito importante que sejam precocemente identificadas as fêmeas que não ficam gestantes, de forma a minimizar as perdas económicas da exploração.

Este exame de diagnóstico de gestação, deveria permitir identificar se uma fêmea não ficou gestante, ainda antes de ela revelar um retorno ao cio, de forma a poder ter outra oportunidade de gestação o mais rapidamente possível, minimizando assim o intervalo entre partos (Christiansen 2021). Este autor refere ainda que o exame deve ser pouco invasivo e de simples execução e interpretação, tendo o propósito de auxiliar ao máximo o produtor nas decisões a serem tomadas em termos de manejo reprodutivo. Tal exame poderá fornecer informações que irão auxiliar esse processo, tais como a fase gestacional, o sexo fetal ou a presença de patologia, quer na vaca, quer no embrião/feto. Atualmente, existem três métodos que permitem a realização do diagnóstico de gestação numa fêmea bovina e, apesar de nenhum deles ser considerado perfeito, todos possuem as suas vantagens e desvantagens (Christiansen 2021). Eles são a palpação transretal, a ecografia transretal e os doseamentos hormonais. De seguida, serão abordados estes tipos de exame, sendo referidas as vantagens e limitações de cada um.

O exame por palpação transretal é um dos métodos mais populares para a deteção e confirmação de uma gestação. Isto deve-se ao facto de ser um dos exames para o qual mais médicos veterinários possuem treino para o efetuar, devido ao baixo custo por animal e pela alta sensibilidade e especificidade que o mesmo revela (Fricke et al. 2016). Neste caso, a confirmação de uma gestação pode ser conseguida a partir do trigésimo dia da beneficiação, visto que consiste na palpação de estruturas que só

se encontram em fêmeas que estão gestantes, sendo algumas palpáveis em fases mais precoces que outras. Estes achados são: o deslize da dupla membrana (membrana corio-alantóide), detetável a partir dos 30-32 dias; a vesícula amniótica, palpável entre os 32-35 dias; o feto, palpável a partir dos 55-60 dias; e os placentomas, palpáveis por volta dos 75-80 dias, por técnicos bastante experientes, sendo mais facilmente palpáveis a partir dos 90 dias (Christiansen 2021). Se nenhum destes achados for detetado, presume-se que a fêmea está não-gestante. O autor refere ainda que existem mais três sinais que podem ajudar na confirmação da gestação: o aumento do tamanho do corno uterino e presença de fluido no seu interior; a imobilização e deslocação cranial do cérvix, provocado pelo aumento do peso do útero; e o aumento assimétrico do diâmetro da artéria uterina ipsilateral ao corno uterino mais dilatado e ao ovário contendo o corpo lúteo (CL) (gravídico), por via da necessidade de um maior aporte sanguíneo (Christiansen 2021). Não obstante das vantagens apresentadas, este exame apresenta alguns inconvenientes. Apesar de ser um exame que permite um diagnóstico a partir dos trinta dias de gestação, não permite que sejam identificadas as fêmeas em que a inseminação artificial (IA) não teve sucesso, antes de retornarem ao cio. Outras desvantagens incluem o risco de transmissão de doenças à fêmea e ao concepto durante a palpação (Christiansen 2021), e a possibilidade de o lesionar, resultando em morte embrio-fetal (Fricke et al. 2016). Os dois últimos potenciais riscos deste exame têm sido abordados por diferentes autores, com resultados distintos. Os dois agentes mais estudados neste âmbito incluem o vírus da diarreia bovina (BVD) e o vírus da leucose bovina (BLV). Um trabalho realizado em 2006 demonstrou a seroconversão de três novilhos num grupo de quatro, após estes terem sido palpados com uma luva de palpação previamente contaminada com sangue de um animal positivo para a BLV, durante um período de três minutos por semana, durante quatro semanas (Kohara et al. 2006). Apesar da confirmação da transmissão através deste exame, a probabilidade de transmissão de BLV em situações de rotina diária continua pouco clara (Kuczewski et al. 2021). No que concerne ao BVD, foi realizado um trabalho onde dez novilhas negativas foram mantidas lado a lado. Depois de ter sido palpada por via retal, uma novilha persistentemente infetada (PI), foram palpadas um total de oito novilhas do grupo, deixando-se duas como grupo de controlo. As palpações foram feitas em três momentos distintos: no primeiro momento, palpavam a novilha 1 até a 3; no segundo, utilizando uma nova luva e procedendo a uma nova palpação da PI, palpavam as novilhas 5 a 7; e, por fim, palpavam, outra vez com uma nova luva e nova palpação da PI, as novilhas 9 e 10. Deste estudo, resultou que todas as novilhas palpadas mostraram sinais ligeiros de BVD e houve seroconversão, enquanto que as que não foram palpadas mantiveram-se negativas (Lang-Ree et al. 1994). Assim, em explorações com registo

de fêmea PI, devem ser tomadas medidas de precaução de modo a evitar a transmissão desta doença (Christiansen 2021).

Quanto à possibilidade de existir morte ou lesão embrionária provocadas pela manipulação da vesícula embrionária ou por lesões membranares, os vários estudos já realizados têm registado resultados antagónicos. Um trabalho demonstrou que fêmeas palpadas antes dos 45 dias de gestação apresentavam uma maior taxa de perdas de gestação que as palpadas numa fase mais avançada da gestação: as vacas palpadas antes dos 35 dias tiveram perdas de gestação no valor de 5,8%, as palpadas entre os 35 e os 45 dias, tiveram 6,0%; e vacas palpadas depois desse dia, tiveram perdas de apenas 0,8% (Paisley et al. 1978). Contudo, estudos mais recentes apontam para que a palpação transretal não tenha um impacto significativo na morte embrio-fetal, como é no caso do ensaio publicado em 2017, que não registou diferenças nas perdas do concepto, no número de vitelos nascidos e anormalidades à nascença, em fêmeas sujeitas à palpação transretal, comparativamente às que tiveram o diagnóstico feito por ecografia transretal (Romano et al. 2017). Pode, então, sugerir-se que o efeito que a palpação transretal tem na mortalidade embrio-fetal é negligenciável, à luz dos trabalhos mais recentes.

A ecografia transretal é o outro método de diagnóstico direto, sendo um exame que pode ser realizado mais precocemente que o exame por palpação transretal. Um médico veterinário experiente, em condições de campo, pode realizar este exame a partir dos 24 dias pós-IA e conseguir confirmar ao produtor que a fêmea não está gestante, com uma eficácia de 89% aos 24 dias, alcançando os 99%, ao dia 26 (Romano et al. 2006). Trata-se de um método pouco invasivo, que requer uma menor manipulação do embrião, o que se traduz numa baixa incidência de morte ou lesão do concepto (Romano et al. 2017). Para além da vantagem de poder ser realizado mais precocemente, este exame também permite avaliar diversos parâmetros gestacionais importantes. Sendo possível, á semelhança do exame realizado por palpação transretal, a identificação de estruturas ováricas, onde a presença de um CL é um possível indicador de gestação. Caso a gestação não seja confirmada, este exame pode auxiliar o veterinário e o produtor na decisão a tomar para que a fêmea fique gestante o mais rapidamente possível (Fricke et al. 2016). A ecografia possibilita ainda a identificação de gestações gemelares e a determinação do sexo fetal, que muitas vezes são informações bastante importantes para o produtor. Como foi referido anteriormente, este exame permite identificar fêmeas não gestantes com alguma facilidade. Porém, afirmar que o animal está gestante é mais difícil. Para comprovar isto, foi realizado um trabalho experimental numa exploração leiteira onde cerca de 2.000 vacas foram examinadas aos 29 dias pós-IA por ecografia transretal para a presença de um CL, do aumento do

volume de líquido uterino e da presença de um embrião ou de batimento cardíaco. Neste estudo, concluiu-se que as vacas que foram tidas como gestantes aos 29 dias pós-IA apenas por análise do aumento do volume de líquido uterino e presença de um CL sem detecção de um embrião ou batimento cardíaco, revelaram uma probabilidade 3,8 vezes maior de estarem não gestantes, aos 74 dias pós-IA (Giordano and Fricke 2012). Assim, estes autores concluíram que o diagnóstico não deve ser decidido antes de ser visualizado o embrião e detetado o seu batimento cardíaco, de forma de potenciar a sua precisão, devendo o técnico estabelecer qual considera ser o dia pós-IA, a partir do qual consegue obter melhores resultados.

A realização de doseamentos hormonais é uma forma indireta de conseguir o diagnóstico de gestação (ou de não-gestação) nos bovinos, uma vez que estes testes detetam a presença/ausência de hormonas ou moléculas específicas associadas à gestação que podem estar em circulação ou no leite, da fêmea testada. Existem diferentes tipos de testes, onde pode ser determinada: a concentração de P₄, a presença de glicoproteínas associadas à gestação (PAGs), o fator de gestação precoce (EPF) ou a detecção do interferão tau (Cain Dempsey 2021). Contudo, estes exames não são muito utilizados na prática devido a alguns fatores. Por vezes, eles conseguem identificar uma fêmea não gestante antes desta retornar ao cio. No entanto, são exames que, na maior parte das vezes, exigem a recolha e envio de uma amostra para laboratório, fazendo com que não tenham uma resposta rápida, enquanto apresentam um encargo financeiro superior. O facto de estes testes terem uma especificidade alta, mas uma sensibilidade baixa, aumentam as hipóteses de falsos positivos, o que acentua ainda mais o facto de não serem uma prioridade para os produtores (Fricke et al. 2016; Cain Dempsey 2021).

3.1.1.3. Pré-parto e parto

Na altura do pré-parto (ou período de transição), a vaca já se encontra no período seco. Trata-se de um período que varia entre os 50 e os 70 dias em que a vaca é induzida a não produzir leite e está dividido em três fases: o período de secagem (os primeiros 4 a 10 dias), o período seco (30 a 40 dias) e o período de transição (últimos 14 a 21 dias) (Roy and Ghosh 2015). As vacas secas devem ser colocadas num parque separado das que continuam a produzir e devem ser estabuladas em grupos. É importante que este parque seja limpo e seco, visto ser um período onde as vacas se tornam mais suscetíveis a doenças como as mastites. Durante esta fase, é importante assegurar uma nutrição correta, de forma a que consigam ter uma condição corporal que facilite o parto e que permita um período pós-parto menos problemático. Garantir tal facto torna-se um desafio devido à redução da capacidade de ingestão de matéria

seca das vacas neste período, em virtude do crescimento do vitelo e das alterações hormonais, pelo que é necessária uma alimentação de boa qualidade e com a utilização de concentrados que permitam suprir as suas necessidades nutricionais (Roy and Ghosh 2015). O período seco é uma fase apropriada para a vacinação e a desparasitação das vacas, de modo a assegurar a proteção, quer da mãe, quer da cria, contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), a BVD e os agentes causadores das diarreias neonatais. Na vizinhança do parto, as fêmeas devem ser transferidas para a maternidade, dando tempo para elas se habituarem ao novo espaço de forma a que não estejam sujeitas a esse stress na fase do parto. A maternidade deve ser um local que permita que a fêmea se sinta confortável e que seja fácil de abordar e isolar a futura mãe, no início do parto, caso seja necessário. Estas instalações devem permitir que todos os animais consigam ter acesso à água, alimento e, área necessária, sem que para tal, tenham que lutar, devem ter uma boa iluminação e serem limpas e secas, com camas de palha confortáveis, podendo ter uma fina camada de areia por baixo da palha de forma a aumentar a aderência e evitar acidentes (Blowey 2016).

3.1.1.4. Intervalo entre partos

O intervalo entre partos é um parâmetro analisado em todas as explorações bovinas, sendo um indicador bastante importante para a avaliação da eficiência reprodutiva de uma exploração (da Costa et al. 2011). Estes autores referem ainda que este período é composto por duas partes e que, idealmente, não deve ter mais de 365 dias. Por um lado, inclui o tempo da gestação que, em média, é de 285 dias. Adicionalmente, engloba o intervalo compreendido entre o parto e a nova conceção, sendo este o lapso temporal que mais pode variar e, que poderá ser controlado através de um manejo correto da vaca. Não obstante, esta fase é afetada por diversas variáveis e os responsáveis pela exploração tendem a definir um período voluntário de espera em que as vacas não são inseminadas, para recuperarem do balanço energético negativo que se faz sentir neste período crítico, para terminarem a involução uterina e reiniciarem a atividade ovárica normal (Chen et al. 2015). Um trabalho realizado em 2022 demonstrou que o aumento do número de dias do período voluntário de espera é benéfico para o retorno à ciclicidade ovárica (Ma et al. 2022). Contudo, é importante para o sucesso da exploração saber balancear os prós e os contras desta medida e o período voluntário de espera mais adequado a adotar. Ao alongar-se em demasia o período voluntário de espera, o produtor corre o risco de não conseguir cumprir com um intervalo entre partos igual ou inferior a 365 dias, pois em caso de insucesso na primeira beneficiação pós período voluntário de espera, a janela temporal para uma nova oportunidade com sucesso e um bom intervalo entre partos, fica bastante reduzida. Por

outro lado, se o período voluntário de espera for demasiado curto, a vaca pode ainda não estar apta para que a IA tenha sucesso.

3.1.1.4.1. Anestro pós-parto

O anestro pós-parto é o período de tempo de aciclia em que não há evidência de cio nas vacas recém-paridas, sendo que o mesmo, muitas vezes, se prolonga por todo o período voluntário de espera e pode até fazer com que este intervalo aumente. Isto deve ser evitado para permitir que a vaca tenha vários ciclos ovários normais antes de ser beneficiada para uma nova gestação (Ambrose 2021). Muitas vezes, o anestro pós-parto pode ser reduzido, não tendo impacto direto na duração do período voluntário de espera, como o refere um estudo realizado em bovinos leiteiros, que demonstrou que cerca de 90% de todas as vacas do ensaio já tinham retomado a atividade ovária ao fim de nove semanas. Contudo, o mesmo estudo salientou que as vacas que retornaram a essa atividade cíclica, mais cedo, experienciaram maior sucesso ao serem sujeitas à IA, após o período voluntário de espera terminar (Bruinjé et al. 2017), o que demonstra a importância da redução do período de anestro pós-parto.

É de notar que o impacto deste período é mais relevante nas vacas com produções leiteiras mais baixas. No caso de vacas de alta produção, na eventualidade de levarem mais tempo a ficarem gestantes, é possível que possam ser mais lucrativas ao produtor, dado que a sua produção ao ser mais elevada permite um maior retorno económico que as vacas com uma produção leiteira inferior (Ambrose 2021). Este autor refere ainda que as causas do anestro pós-parto são multifatoriais, e podem ser distribuídas por cinco categorias: fisiológicas, nutricionais, de manejo, ambientais e patológicas. Seguidamente serão abordadas algumas das causas de maior importância.

3.1.1.4.1.1. Nutrição

A nutrição da vaca é um dos fatores determinantes na duração do anestro pós-parto, já que logo após o parto irá ser necessário um significativo nível de energia para a produção de leite. Esta condição, aliada ao facto de no período perinatal as fêmeas revelarem um défice da ingestão de matéria seca, necessária para satisfazer as suas necessidades energéticas, leva a que as mesmas padeçam de um balanço energético negativo (BEN) (Ambrose 2021).

Durante o período em que as vacas se encontram em BEN ocorre uma elevação dos valores da hormona do crescimento (GH), enquanto que por outro lado a insulina e a IGF-1 revelam níveis bastante reduzidos (Lucy 2007). Este aumento da GH promove a gluconeogénese ao nível hepático e uma lipólise, aumentando assim o nível dos ácidos gordos não esterificados (NEFAS). O aumento conjunto dos NEFAS e da GH

desencadeia uma antagonização dos efeitos da insulina, dando origem a uma resistência a esta última, o que direciona o uso da glucose maioritariamente para os tecidos mamários (Lucy 2007). Como já foi referido, sabe-se que o metabolismo tem um grande impacto na fertilidade e, como tal, vacas que estejam em stress metabólico, como é o caso do período pós-parto, têm uma menor concentração de gonadotrofinas, provocada pelo baixo nível de insulina e de IGF-1. Além disto, acresce ainda o facto de as células da granulosa e da teca possuírem recetores para a IGF-1, o que revela a importância deste fator para o crescimento e desenvolvimento foliculares (Lucy 2000). Tudo isto leva a uma diminuição da produção dos níveis de estrogénios (E_2) pelo folículo, hormonas fulcrais para que ocorra a ovulação. Há ainda, com o aumento da produção leiteira, uma maior atividade hepática e, conseqüentemente, um aumento do metabolismo dos esteroides, reduzindo-se os teores de E_2 e de P_4 a nível sanguíneo (Butler 2003). A conjugação destes eventos conduz a uma diminuição da atividade ao nível do sistema hipotálamo-hipófisário e, conseqüentemente, a uma menor libertação de gonadotrofinas e a um atraso no reinício da atividade ovárica normal.

Há formas de tentar reduzir o impacto do BEN no anestro pós-parto, que consistem essencialmente numa restrição dos níveis energéticos da dieta fornecida às vacas no período seco. Um ensaio realizado em 2006 demonstrou que vacas, apesar de terem sido sujeitas a uma alimentação com níveis energéticos baixos durante o período seco, apresentaram durante esse período, um consumo de matéria seca mais reduzido, um aumento dos NEFAS e um nível de glucose reduzido, em comparação com as que tiverem uma alimentação *ad libitum*. No período pós-parto, os resultados inverteram-se, tendo as vacas que anteriormente tinham sido alimentadas com a dieta restritiva ingerido maiores quantidades matéria seca, revelando adicionalmente uma redução dos NEFAS, facto que pode levar a uma redução do anestro pós-parto por causas nutricionais (Douglas et al. 2006).

3.1.1.4.1.2. Patologias do período puerperal

Existem diferentes patologias que podem afetar a duração do anestro pós-parto. De seguida, vão ser expostas algumas das afeções que podem estar na sua origem.

A inflamação uterina revelou ser um fator importante para o atraso do retorno à ciclicidade ovárica normal após o parto. Com um número elevado de bactérias no lúmen do útero, irá coexistir um nível elevado de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) em circulação. Esta condição resulta em alterações físicas, devido à reação inflamatória ao nível das paredes uterinas com a chamada de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), e ação das citocinas e quimioquinas, produzidas pelo endométrio, após a deteção dos LPS pelos recetores endometriais, bem como de alterações endócrinas, o que em

conjunto levam a uma redução do desempenho reprodutivo (Sheldon et al. 2009). Com a presença de LPS em circulação, ocorre uma modulação hormonal, em que a GnRH e a LH sofrem uma redução nos seus níveis de produção. Porém, os níveis de FSH mantêm-se inalterados, ou seja, apesar de existirem ondas de desenvolvimento folicular, embora mais lentas, dada a influência dos LPS sobre as células da granulosa e a uma produção de E₂ mais reduzida (Williams et al. 2007), dificilmente ocorrerá uma ovulação (Sheldon et al. 2009). No entanto, caso ela ocorra antes da redução da carga bacteriana presente no trato reprodutivo, a circulação de LPS provoca uma inversão da produção da PGF_{2α} para produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), pelas células do endométrio. Esta última, leva à manutenção do corpo lúteo por um período de tempo mais prolongado, o que explica as fases lúteas de longa duração em algumas vacas com inflamação uterina pós-parto (Sheldon et al. 2009).

O número de PMN no útero é regularmente utilizado como método de definição de inflamação uterina. Um estudo referiu que vacas com um maior número de PMN tinham um intervalo entre o parto e a primeira ovulação 13 dias superior (45 dias), quando comparadas com vacas que não apresentavam sinais de inflamação uterina (32 dias) (Dourey et al. 2011).

Há a registar, também, a influência de outras afeções que podem ocorrer na altura do parto, como é o caso do parto distócico, do parto gemelar ou de partos com nado-mortos/abortos, ou no pós-parto recente, como a retenção placentária, que podem levar a um adiamento do retorno à ciclicidade (Ambrose 2021). Demonstrou-se que fêmeas com este tipo de complicações tinham uma probabilidade três vezes mais elevada de ter um intervalo entre parto e retorno à ciclicidade mais longo, que as que tinham um parto e um período peri parto considerados normais (Opsomer et al. 2000). Estes distúrbios levam a patologias do trato reprodutivo, em que a parede uterina sofre lesões mais importantes que as que ocorrem após um parto eutócico. A involução uterina atrasa-se e o ambiente uterino torna-se adequado à colonização bacteriana e ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória, com as suas consequências, já anteriormente mencionadas, sendo esta a principal razão da perturbação da atividade ovárica (Djuricic et al. 2012).

Doenças como mastites, laminites, pneumonias ou os problemas metabólicos, como a cetose, foram identificados como sendo patologias que afetam a capacidade de a vaca retornar à ciclicidade normal (Ambrose 2021). Este retorno é grandemente afetado pela redução do consumo de matéria seca, o que associado a doenças com manifestação clínica, leva a que a vaca venha a sofrer de BEN (Opsomer et al. 2000). Estes autores salientaram que estas doenças, no seu conjunto, excluindo a cetose, contribuem para uma possibilidade 5,4 vezes superior de aumentar o intervalo até à

primeira ovulação, sendo que a cetose pode contribuir para uma probabilidade 11 vezes maior a que tal ocorra, em comparação com vacas saudáveis.

3.1.1.4.1.3. Produção Leiteira

Ao longo dos últimos anos, tem sido postulado que o aumento da capacidade de produção das vacas leiteiras tem sido alcançado em detrimento de outras características, incluindo a reprodução. Sabe-se agora que todas estas características são grandemente determinadas geneticamente e que a correlação entre a produção leiteira e a aptidão reprodutiva não está assente numa única ligação. Assim, com a correta seleção de certas características genéticas, pode conseguir-se uma melhoria de ambos os parâmetros, em simultâneo (Berry et al. 2016). Dois trabalhos referiram, na discussão dos seus resultados, os pontos que favorecem a teoria de que um maior nível de produção leiteira poderá não afetar o retorno à ciclicidade de forma tão direta. No primeiro, as vacas foram divididas em dois grupos, tendo como base os valores dados pelo indicador “305-Day Mature Equivalent Milk Production”: o primeiro grupo incluiu vacas com produções entre os 5.000 e os 9.500 kg de leite, enquanto que o segundo era constituído por vacas que produziam mais de 9.500 kg de leite nesse mesmo intervalo. Verificou-se que, no primeiro grupo, por cada aumento de 100 kg de leite, no intervalo de tempo definido, havia uma diminuição da anovulação de 2% e que, no segundo grupo, aquele risco não aumentou com o aumento da produção (Walsh et al. 2007). No segundo ensaio, foi evidenciado que as vacas que estavam no quartil inferior do nível de produção, nos primeiros 90 dias pós-parto (32,1 kg/dia) apresentavam uma maior probabilidade de não retornarem à ciclicidade aos 65 dias pós-parto que as vacas com os quartis de produção mais elevados (39,1 kg/dia, 43,6 kg/dia, 50,0 kg/dia) (Santos et al. 2009). Estes resultados parecem sugerir que o nível de produção não afeta diretamente a capacidade de as vacas deixarem o anestro pós-parto. Ao invés disto, revelam a incapacidade das fêmeas de conseguirem consumir matéria seca suficiente para suprir as suas necessidades energéticas, entrando em BEN (Ambrose 2021).

3.1.1.4.2. Reinício da atividade cíclica

Durante a gestação, os níveis de P_4 e de E_2 são bastante elevados, o que potencia um efeito inibidor sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, que permite a manutenção da gestação, sendo que o aumento dos níveis de E_2 é em muito, superior ao dos de P_4 (Ambrose 2021). Este aumento de ambos os esteroides leva a uma estimulação contínua da GnRH e consequentemente da LH, que vai fazer com que, mesmo que o mecanismo de libertação desta última hormona esteja preservado, haja um esgotamento das suas reservas (Nett 1987). Tal não acontece com a FSH, que

mantém a sua concentração baixa no período pré-parto, contudo após o parto existem picos de liberação de FSH que são associados ao surgimento de ondas de desenvolvimento folicular (Crowe et al. 1998).

Estas alterações vão fazer com que, no período pós-parto, seja necessário um período de tempo para que a harmonia deste complexo sistema hormonal volte a ser restabelecida. Na proximidade do parto, os níveis de P_4 começam a diminuir, enquanto que os níveis de E_2 só decrescem após o parto (Robertson 1974), coincidindo com a expulsão das secundinas, que incluem a placenta, a grande produtora desta hormona. Com a diminuição do teor destas hormonas, o eixo hipotálamo-hipofisário deixa de estar bloqueado, podendo aos poucos voltar ao seu funcionamento normal (Ambrose 2021). A partir do terceiro dia pós-parto, forma-se uma nova onda folicular (Crowe et al. 1998) que, para a sua progressão, irá necessitar do normal funcionamento da FSH e LH, o que ainda não está assegurado por via do esgotamento da LH durante a gestação. Os picos de LH nesta fase inicial são de baixa frequência, pelo que de modo a serem atingidos níveis de armazenamento suficientes para a ocorrência de picos de LH com a frequência normal, é necessário um período de pelo menos três semanas, período este que poderá variar de acordo com os fatores já referidos que condicionam o reinício da atividade ovárica normal (Ambrose 2021).

Um outro ensaio demonstrou que pode existir uma influência da kisspeptina, no retorno à ciclicidade, dado a mesma estimular o eixo hipotálamo-hipofisário. Nesse trabalho, foram determinados os níveis periféricos da kisspeptina, tendo-se verificado que, após um “plateau”, havia um aumento dos níveis deste péptido do décimo quarto até ao décimo sexto dia pós-parto, voltando a decrescer após este intervalo de tempo. Esta modificação estimulou a produção da GnRH e, por via disso, toda a restante resposta hormonal (Rizzo et al. 2019).

3.1.3. Condição corporal e a atividade reprodutiva

É do conhecimento geral que a nutrição é um fator de extrema importância para assegurar o bem-estar e saúde dos bovinos, sendo um dos que mais afeta o normal funcionamento da atividade ovárica e, sobretudo, o retorno à ciclicidade após o parto. Assim, o manejo alimentar de uma exploração é algo fulcral para o seu sucesso empresarial (Diskin and Kenny 2016).

A gordura corporal é acumulada nos períodos em que a ingestão de alimento permite um fornecimento energético superior ao que o animal necessita, levando assim à formação de reservas corporais. Assim, para permitir que tal aconteça, o animal deve ser alimentado com mais vigor em alturas pré-determinadas (Diskin and Kenny 2016). Utilizando o exemplo de uma vaca leiteira gestante, deve existir uma maior

disponibilidade alimentar a meio da gestação, visto que as necessidades energéticas são menores que no início e no fim da gestação e, com o aproximar do parto, a capacidade da fêmea de ingerir matéria seca vai-se reduzindo, o que dificulta o aumento das reservas corporais da fêmea, por essa altura (Diskin and Kenny 2016). A importância do estado nutricional para o sucesso reprodutivo da vaca leiteira foi apresentada por Short e Adams (1988), que estabeleceram as prioridades na utilização de energia, por parte da fêmea bovina: I. metabolismo basal; II. atividades mecânicas; III. crescimento; IV. conjunto de reservas corporais básicas de energia; V. manutenção da gestação; VI. lactação; VII. reservas extra de energia; VIII. ciclo éstrico, ovulação e gestação precoce; IX. excesso de reservas; onde as atividades do foro reprodutivo ocupam as posições inferiores.

Há várias formas de avaliar o estado nutricional de um animal. Porém, as duas mais eficazes são o peso do animal e a sua condição corporal (CC). A avaliação através da CC é uma forma de determinar o estado nutricional por via de uma avaliação visual e/ou tátil das reservas adiposas do animal, de forma rápida, conveniente e barata, que permite obter informação acerca das mesmas, independentemente do seu estado fisiológico e do seu tamanho, o que não se consegue através do peso corporal, permitindo a tomada de decisões mais acertadas quanto ao manejo nutricional dos animais (da Costa et al. 2011). Para a avaliação da CC, são atribuídas notas ao animal, existindo várias escalas com diferentes graus de classificação que se baseiam em diferentes pontos anatómicos. Utilizando-se a escala de 1 (caquético) a 5 (obeso), após a observação e palpação de locais estratégicos, é atribuída uma classificação que representa a CC do animal avaliado. Ela é atribuída com base na observação e/ou palpação de marcos anatómicos, tendo-se a perceção da acumulação de gordura e músculo nesses locais (da Costa et al. 2011). Estes autores referem que os principais pontos anatómicos sujeitos à avaliação são as costelas, as apófises espinhosas e as transversas, o cavado do flanco, as tuberosidades ilíaca e isquiática, a base da cauda e as vertebrae lombares e sagradas.

Esta avaliação da CC dos animais ajuda ao sucesso reprodutivo uma vez que, como já referido anteriormente, o estado nutricional de uma fêmea afeta etapas importantes, como a idade à puberdade e o reinício da atividade ovárica pós-parto.

3.2. Fundamentos teóricos sobre a indução/sincronização da ovulação

Atualmente, a utilização da IA nas explorações de bovinos leiteiros é muito expressiva e, de forma a assegurar que as fêmeas tenham um intervalo entre partos máximo de 365 dias, a deteção do cio e a fecundidade são muito importantes. Assim, uma deteção de cio que não seja realizada de forma eficiente e correta pode acarretar

consequências devastadoras para o sucesso reprodutivo de uma exploração (Kasimanickam 2021a). Como forma de ultrapassar este problema, foram criados inúmeros protocolos de indução/sincronização de ovulação, que podem ser aplicados na rotina diária das explorações. Estes procedimentos, que se baseiam nos conhecimentos atuais da dinâmica ovárica, devem permitir que o estro e a ovulação sejam induzidos num intervalo de tempo pré-determinado, garantindo a obtenção de taxas de gestação comercialmente aceitáveis, ao primeiro serviço (Diskin et al. 2002).

De modo a garantir que um programa de sincronização tenha sucesso, há diversas etapas do ciclo éstrico que deverão ser controladas. Estas etapas baseiam-se na indução farmacológica de uma nova onda de desenvolvimento folicular, o controlo da vida útil do CL e a indução da ovulação. Para a manipulação destas fases do ciclo ovárico, existem fármacos específicos que podem ser utilizados.

Para a indução de uma nova onda folicular, com o recurso a hormonas exógenas, que permitam que no final da mesma, exista um folículo dominante pronto para ovular um oócito competente, deve certificar-se que três processos sejam cumpridos: em primeiro lugar, qualquer onda folicular que esteja em desenvolvimento naquele momento deve ser interrompida; em segundo lugar, tem de haver uma elevação da FSH que leve ao surgimento de uma nova onda folicular; e, por fim, deve ser assegurado o normal crescimento de um folículo dominante, após a seleção (Kasimanickam 2021a). Para que isto seja conseguido sem a utilização de hormonas esteróides, utiliza-se a GnRH, que induz picos de FSH e LH, levando à ovulação ou à atresia de um folículo existente, e assim, ao surgimento de uma nova onda folicular (Twagiramungu et al. 1995). A administração da GnRH após a seleção do folículo dominante, por via do aumento das hormonas gonadotrofinas, induz a ovulação e o desenvolvimento de uma nova onda folicular, 1,5-2 dias depois dessa ovulação (Twagiramungu et al. 1995). No entanto, caso a GnRH seja administrada antes da seleção do folículo dominante, não irá existir uma ovulação, devido à ausência de recetores de LH nas células da granulosa dos folículos em crescimento, hormona esta de extrema importância para que ocorra a ovulação de um folículo (Kasimanickam 2021a). Assim, o momento em que é administrada a GnRH deve ser tido em consideração no protocolo de sincronização selecionado, uma vez que a resposta da fêmea à GnRH pode variar.

No controlo da duração da vida do corpo lúteo, existem duas opções que podem ser tomadas através da administração de fármacos diferentes. A primeira opção consiste no encurtamento da fase lútea. A luteólise é um processo que ocorre naturalmente, sendo desencadeada pelo aumento do nível de E₂ com origem no folículo pré-ovulatório, que leva à produção de oxitocina que, por sua vez, promove a produção

uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e, num processo de “feedback” positivo, há uma estimulação por ambas as partes, da produção de mais oxitocina e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Milvae 1986). Esta última induz alterações na circulação sanguínea do parênquima do corpo lúteo, bem como a alterações morfológicas do mesmo, o que conduz a uma redução das células produtoras de P_4 e à apoptose de células lúteas, dando-se assim a degenerescência do corpo lúteo (Hansel et al. 1991). A administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem sido comumente utilizada para a indução da regressão precoce do corpo lúteo. Porém, esta regressão só acontece na presença de um corpo lúteo funcional, não existindo resposta em casos como o das novilhas pré-puberes ou vacas que estejam em anestro, por exemplo. Para além disto, também não existe uma resposta positiva ao tratamento quando a administração ocorre nos primeiros seis dias pós-estro, devido à baixa concentração de recetores para a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no corpo lúteo recém-formado (Kasimanickam 2021a) ou após o dia 17 do ciclo. A luteólise assim induzida é rápida, mas o intervalo entre o tratamento e o estro é variável, dependendo da fase de desenvolvimento da onda folicular, no momento. Isto é, caso estejamos na presença de um folículo dominante, é esperado que o estro ocorra dois a três dias após o tratamento. Porém, se o folículo se encontrar numa fase de pré-dominância ou até mesmo numa fase de regressão da onda, o estro vai surgir apenas quatro a seis dias depois, uma vez que o folículo necessita de mais tempo para completar o seu desenvolvimento e ovular (Kasimanickam 2021a).

A outra opção para o controlo do tempo de vida de um corpo lúteo consiste no prolongamento da sua existência com o recurso de uma fonte exógena de P_4 . Esta hormona atua inibindo a frequência de picos de LH e bloqueia a ovulação (Lane et al. 2008). Tratamentos com uma duração de 14 ou 21 dias têm vindo a demonstrar uma resposta positiva, proporcionando um elevado número de fêmeas em estro num período de três dias após o fim do programa. Não obstante, tratamentos longos com P_4 , têm revelado uma quebra da fertilidade, comparativamente aos tratamentos mais curtos, como foi demonstrado por Macmillan e Peterson (1993), que verificaram que a fecundidade diminuiu de 60,5%, em animais tratados durante 7 dias com P_4 seguida de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para 39,8% em animais tratados unicamente com a P_4 durante 21 dias, registando-se ainda um valor de 45,8% em animais tratados durante 14 dias unicamente com P_4 (Macmillan and Peterson 1993). Isto acontece porque os tratamentos não permitem que sejam atingidos os níveis de P_4 tão elevados como se verifica num ciclo não manipulado, levando a que os níveis de E_2 e os picos de LH, apesar de menos expressivos, continuem a ter influência no desenvolvimento do folículo que vai crescer e envelhecer, originando as quebras de fertilidade, no caso dos tratamentos de longa duração (Austin et al. 1999). De forma a otimizar os protocolos com recurso à P_4 , foram idealizados dispositivos intravaginais que a libertassem, de forma a ser mantida uma

concentração sanguínea superior a 1 ng/mL, existindo diferentes opções que variam na forma, quantidade de P₄ e no material de que são feitos. No mercado, pode encontrar-se o dispositivo intravaginal de libertação de progesterona (PRID) impregnado de 1,55 g; o dispositivo intravaginal de libertação controlada do fármaco (CIDR), impregnado com 1,38 g, nos Estados Unidos da América ou com 1,9 g, no Canadá, e o dispositivo intravaginal de progesterona Cue-Mate (IPVD), com 1,56 g (Kasimanickam 2021a). Estes dispositivos têm demonstrado elevada eficácia, com cerca de 85% das fêmeas a revelarem sinais de cio, 36 a 72 horas depois de serem removidos, provando ser uma ótima ferramenta para os programas de sincronização da ovulação (Kasimanickam 2021a).

3.2.1. Protocolos de indução/sincronização da ovulação

Existem vários protocolos de indução/sincronização da ovulação que têm demonstrado sucesso no universo da produção bovina, concorrendo para uma melhoria da performance reprodutiva das explorações, sendo que devem ser estudados, assim como as características de cada exploração, de forma a serem selecionados aqueles que melhor se enquadram na realidade de uma dada exploração. Seguidamente, irão ser abordados mais aprofundadamente os princípios teóricos dos protocolos de sincronização da ovulação utilizados no decurso do trabalho experimental

3.2.1.1. Ovsynch e pré-sincronização

O Ovsynch é um dos protocolos mais usados e consiste numa administração de GnRH seguida de uma injeção de PGF_{2α}, sete dias depois, terminando-se com uma segunda injeção de GnRH, 48 horas após a administração da PGF_{2α} (Kasimanickam 2021a). A IA deve ser realizada a tempo fixo num intervalo compreendido entre as 8 e as 24 horas após a última administração de GnRH, sendo que o melhor resultado é obtido às 16 horas após aquela administração. Esta conclusão é suportada por um trabalho realizado em 1998, onde foi avaliada a taxa de concepção, entre outras variáveis, em função do número de horas entre a última injeção de GnRH e a IA. Neste trabalho, as vacas foram inseminadas às 0, 8, 16, 24 e 32 horas após a administração da GnRH, tendo-se verificado que a taxa de concepção mais elevada foi obtida com a IA 16 horas após GnRH (45%). Concluiu-se que as taxas de concepção mais baixas foram registadas quando a IA inseminação foi realizada às 0 e às 32 horas após a GnRH (Tabela 1). Contudo caso, seja necessário alterar a hora da IA por comodidade do produtor, ela deverá ser realizada mais precocemente e nunca adiada para as 32h pós-GnRH (Pursley et al. 1998).

Tabela 1: Taxa de concepção em função da hora de realização da IA, após a última injeção de GnRH, do protocolo “Ovsynch” (Pursley et al. 1998).

Horas desde a última injeção de GnRH e a IA	Taxa de concepção (%)
0	37
8	41
16	45
24	41
32	32

Neste protocolo, recorre-se a uma primeira injeção de GnRH de forma a provocar a ovulação ou a luteinização de um folículo, promovendo assim o surgimento de uma nova onda folicular aproximadamente três dias depois da administração. De seguida, a injeção de PGF_{2α} (sete dias depois) vai induzir a luteólise do CL formado ou pré-existente, de modo a que a segunda administração de GnRH possa desencadear uma nova ovulação, sincronizando assim as vacas sujeitas a tratamento (Kasimanickam 2021a). O Ovsynch demonstrou ser um método eficaz para assegurar o sucesso reprodutivo de uma exploração, resultando em taxas de sucesso à primeira IA semelhantes às obtidas com vacas não tratadas e sujeitas à IA após deteção de cio. Isto foi demonstrado num estudo que referiu que vacas tratadas com o protocolo Ovsynch tiveram uma taxa de sucesso à primeira IA de 37%, em comparação com os 39%, registado nas vacas não tratadas (Pursley et al. 1997). Este ensaio revelou ainda que o número de animais que se encontravam gestantes 60 e 100 dias pós-parto, foi superior em vacas que foram tratadas, em comparação com as não tratadas, reforçando uma outra vantagem do Ovsynch.

Como forma de assegurar uma resposta ainda mais positiva, o protocolo clássico já descrito, foi sujeito a diversas variantes, como é o caso da adição de uma segunda injeção de PGF_{2α}, 24 horas após a primeira administração. Esta estratégia tem demonstrado resultados positivos, tendo sido sugerido que o seu êxito se deveria ao facto de o CL formado ser demasiado jovem e ainda não ser sensível à primeira injeção de PGF_{2α}, mas já recetivo à segunda administração, 24 horas depois (Nowicki et al. 2017). Um outro trabalho realizado em 2015, demonstrou o sucesso desta medida, onde quatro grupos de vacas foram avaliados, sendo que o primeiro foi sujeito a um protocolo Ovsynch clássico; o segundo, a um Ovsynch com uma pré sincronização com GnRH; o terceiro, a um Ovsynch com a dupla injeção de PGF_{2α}; e, o último grupo, foi sujeito a Ovsynch com dupla injeção de PGF_{2α} e pré-sincronização com GnRH. Nos dois grupos em que a dupla injeção de PGF_{2α} foi realizada, as taxas de gestação à IA foram significativamente superiores, relativamente aos grupos de única administração (Carvalho et al. 2015).

Uma variável que pode afetar o sucesso de um protocolo de sincronização é a fase do ciclo em que a fêmea se encontra quando o mesmo é iniciado. Um estudo de 1999 reportou as diferenças relativamente ao momento em que o Ovsynch foi instituído. Neste trabalho, constatou-se que, apesar de grande parte das vacas serem sincronizadas, o protocolo foi menos eficiente quando iniciado no final da fase lútea (dias 13-22), em comparação com as vacas cujo protocolo foi iniciado mais cedo (dias 1-12), sobretudo quando a primeira injeção de GnRH não induziu ovulação. Os resultados obtidos referem uma taxa de sincronização de 80% nas vacas do fim do ciclo, contra uma taxa de 91%, das fêmeas no início do ciclo (Vasconcelos et al. 1999). Apesar do nível mais elevado de sincronização com as vacas em que o programa se iniciou mais cedo no ciclo, a taxa de gestação foi inferior à das fêmeas em que o protocolo foi iniciado a meio do ciclo, sugerindo os autores que o tamanho do folículo pré-ovulatório terá sido determinante nos resultados. Um outro ensaio explorou este tema, comparando as taxas de ovulação e de gestação, em vacas sujeitas ao Ovsynch, 6 dias após a deteção de cio, com outras fêmeas que iniciaram o protocolo numa fase aleatória do ciclo. Foi demonstrado que as duas taxas diminuíram no grupo de vacas tratadas numa altura aleatória do ciclo éstrico, comparativamente ao grupo tratado aos 6 dias após cio (Dirandeh 2014). Estes dois trabalhos demonstram a importância de se conhecer em que fase do ciclo a vaca se encontra aquando do início do tratamento farmacológico. Como estratégia de suporte, pode recorrer-se a uma pré-sincronização, que permite ter uma maior segurança na melhor oportunidade de início do programa. Um dos protocolos de pré-sincronização utilizados é o Double-Ovsynch. Como o próprio nome indica, o Double-Ovsynch consiste num protocolo que usa um protocolo Ovsynch duas vezes, sendo que existe um intervalo de sete dias entre ambos (Wiltbank and Pursley 2014). Este protocolo demonstrou resultar em taxas de gestação à IA mais elevadas que outro protocolo de sincronização, num ensaio publicado em 2017, em que foram estudados dois grupos de vacas: um grupo foi sujeito a um protocolo de Double-Ovsynch com dupla injeção de PGF_{2α}; enquanto o segundo grupo foi sujeito a outro protocolo de sincronização que consistia numa administração de GnRH, seguida de uma de PGF_{2α} 7 dias depois, e 14 dias depois desta última, as vacas receberam duas injeções de PGF_{2α}, espaçadas de 24 horas; as vacas que exibiram sinais de cio no intervalo compreendido entre os 2 dias antes e os 7 dias depois das duas injeções de PGF_{2α} foram inseminadas 12 horas depois dessa deteção. Os autores concluíram que as vacas sujeitas ao Double-Ovsynch registaram uma taxa de submissão 23% mais elevada, que as vacas em que a IA foi executada após a deteção de cio e que a sua taxa de gestação foi superior em 27% aos 33 dias pós-IA (Santos et al. 2017). Em concordância com este trabalho, um outro veio a confirmar que há uma melhoria da fertilidade com o Double-Ovsynch em

comparação com o Ovsynch simples, como estratégia de ressincronização após uma IA, tendo as vacas sujeitas ao Double-Ovsynch registado uma taxa de gestação de 39%, enquanto que o outro grupo se ficou por 30%, após o diagnóstico de gestação aos 29 dias pós-IA a tempo fixo (IATF) (Giordano et al. 2012). Assim, pode concluir-se que o Double-Ovsynch poderá ser uma ferramenta muito útil numa vacaria de leite, uma vez que tem registado uma eficácia tão boa ou melhor que outros protocolos de pré-sincronização ou que um protocolo Ovsynch simples.

3.2.1.2. Co-Sincronização (Co-Synch)

Este é um protocolo de sincronização da ovulação que tem como base os mesmos preceitos teóricos do Ovsynch. A diferença entre ambos reside no facto de, no caso do Co-Synch, a segunda administração de GnRH ser feita no momento da IATF, o que permite que as fêmeas a ele sujeitas necessitem de ser manipuladas e contidas menos vezes que no protocolo Ovsynch, reduzindo-se o stress nos animais e igualmente, os recursos utilizados, o que torna um protocolo muito utilizado para explorações que tenham as fêmeas a campo, como é o caso das explorações de bovinos de carne (Kasimanickam 2021a). Este protocolo, bem como o Ovsynch, pode beneficiar de uma suplementação com P_4 no período compreendido entre a primeira administração de GnRH e a $PGF_{2\alpha}$ (7 dias), de forma a melhorar a sincronização das fêmeas a ele sujeitas (Kasimanickam 2021a). Uma variante deste protocolo tem sido utilizada para sincronização de bovinos, e consiste numa redução do período de tempo entre a primeira administração de GnRH e a injeção de $PGF_{2\alpha}$, de 7 para 5 dias, associada a um aumento do número de horas entre a administração da $PGF_{2\alpha}$ e a segunda administração de GnRH, com a IATF a ter lugar às 72 horas, sendo conhecida por Co-Synch 5. Um ensaio realizado em vacas de carne com quatro experiências diferentes comparou este Co-Synch 5 com o protocolo de Co-Synch clássico e registou que as fêmeas sujeitas ao primeiro tiveram uma taxa de gestação por IATF semelhante à das fêmeas do protocolo Co-Synch, em duas das quatro experiências e que, nas outras duas, a taxa de gestação foi superior nas vacas sujeitas ao Co-Synch 5. Um ponto importante a ter-se em conta é o diâmetro do folículo que vai ovular, daí ser importante o aumento do número de horas entre a administração da $PGF_{2\alpha}$ e a segunda injeção de GnRH e, conseqüentemente, a IATF. Ao aumentar este intervalo, vai haver um alongamento do pró-estro o que possibilita um maior desenvolvimento do folículo, o que o torna mais competente por altura da ovulação (Bridges et al. 2008). Wiltbank e Pursley (2014) referiram como hipótese explicativa da causa da redução de fertilidade em períodos de desenvolvimento folicular mais curtos, o facto de existir uma menor concentração de E_2 antes da ovulação e que, devido ao menor desenvolvimento

folicular, o corpo lúteo formado após a ovulação tenha o seu tempo de vida útil encurtado, não sendo capaz de produzir P_4 suficiente, durante o tempo necessário, para a manutenção de uma eventual gestação. Uma preocupação com a utilização deste protocolo é a hipótese de o corpo lúteo formado depois da ovulação, subsequente a primeira administração de GnRH, não seja sensível à $PGF_{2\alpha}$, cinco dias depois, o que se traduzirá em insucesso do tratamento. Por isso, uma segunda administração de $PGF_{2\alpha}$, seis a doze horas depois da primeira, demonstrou ser uma opção eficaz para colmatar esta fragilidade (Kasimanickam 2021a). Tal facto foi também demonstrado num ensaio que confirmou que vacas sujeitas a duas injeções de $PGF_{2\alpha}$, espaçadas de seis horas, registaram um maior número de gestações que aquelas foram sujeitas a uma única administração, no momento de retirada do CIDR, quer a dose tenha sido mais baixa ou mais elevada (Say et al. 2016).

3.3. Eficácia da inseminação artificial

Para aumentar as hipóteses de sucesso da IA, ou seja, conseguir a fertilização de um ócito competente por parte de um espermatozoide previamente depositado no trato reprodutivo da fêmea, dando assim início a uma gestação, existem vários fatores que podem condicionar o resultado final e que, devem ser estudados e controlados. A seguir serão abordados alguns desses fatores que podem estar ligados às diferentes variáveis envolvidas.

3.3.1. A inseminação artificial

A IA é um procedimento que permite a introdução de sémen no interior do trato reprodutivo feminino com o auxílio de um instrumento e é a mais antiga tecnologia reprodutiva existente. Em 1784, Spallanzani conseguiu inseminar com sucesso uma cadela que veio a parir três cachorros. Esta técnica teve um grande desenvolvimento na década de 1940 e começou maioritariamente a ser utilizada por razões sanitárias (Foote 2002). Os grandes avanços nas várias componentes envolvidas neste processo, como a criopreservação do sémen, as vantagens económicas da IA e o aumento da intensidade do progresso genético, potenciaram a IA de modo a que hoje seja a tecnologia reprodutiva mais utilizada em todo o mundo (Kasimanickam 2021b). Para que a IA resulte em sucesso, todos os elementos envolvidos devem estar plenamente focados nesse objetivo. A dose seminal utilizada é um dos fatores fulcrais para uma IA positiva. Todas as etapas desde a recolha, o processamento, o armazenamento e o manuseio, devem ser meticulosamente realizadas de forma a assegurar a máxima qualidade do sémen. Um outro aspeto muito importante tem a ver com a seleção dos

animais: o touro dador do sêmen utilizado e a fêmea que vai ser inseminada, devem ter uma ótima fertilidade (Kasimanickam 2021b).

3.3.1.1. A técnica

O ato da IA é algo que deve ser estudado e treinado com bastante afinco, uma vez que, para além de todo o treino necessário para se conseguir ultrapassar as barreiras naturais do trato reprodutivo feminino e alcançar o local ideal para a deposição do sêmen, o inseminador tem de possuir bons conhecimentos da anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor, de modo a conseguir entender todo o processo e, caso necessário, atuar em conformidade, se houver algum imprevisto. Deve ser ainda transmitida ao inseminador, a importância da higiene e sanidade em todo este processo visto que, em termos simplistas, está a ser introduzido no organismo de uma fêmea, um elemento estranho que pode ser uma fonte de problemas para a saúde da mesma (Kasimanickam 2021b). Várias técnicas foram desenvolvidas ao longo do tempo para a realização da IA, sendo a terminologia indicadora do local onde ocorre a deposição do sêmen, nomeadamente inseminação no corpo do útero, inseminação intracornual profunda, inseminação intracornual bilateral ou inseminação intra-folicular. De todas estas opções, a técnica mais comumente utilizada é a IA com deposição do sêmen no corpo do útero (Kasimanickam 2021b). Para se realizar esta técnica, recorre-se à fixação do cérvix por via transretal, conduzindo-se a cânula de IA através do canal cervical até ao local de deposição do sêmen. Mais detalhadamente, esta cânula deve ser protegida por uma bainha de IA que evita a sua contaminação e a da fêmea que deverá, por sua vez, estar presa, de forma a serem evitados movimentos que possam prejudicar o trabalho. Segue-se a palpação transretal com a remoção das fezes da ampola retal, a fim de possibilitar a identificação das estruturas do aparelho reprodutor, mais especificamente o cérvix, que deve ser então firmemente agarrado, fixando-o. A vulva deve ser limpa com toalhetes de papel e, depois é introduzida a cânula através da fenda vulvar. O instrumento deve ser inserido sem contactar com os lábios vulvares e num ângulo de aproximadamente 40 graus, de forma a evitar o meato urinário e/ou o divertículo suburetral. Seguidamente, deve percorrer todo o comprimento da vagina na horizontal até alcançar a porção posterior do cérvix – a flor desabrochada. Nesta altura, é crucial evitar que a cânula fique retida no fundo de saco que existe em torno da abertura posterior do cérvix. Neste momento, a camisa sanitária que protege a cânula durante o percurso vaginal, é repuxada para uma entrada limpa no canal cervical. Neste espaço, perde-se, de alguma forma, a percepção tátil da cânula e tem que se evitar as 3-4 pregas cervicais circulares para se progredir em direção ao óstio anterior do cérvix. A entrada no corpo do útero é marcada pela retoma da percepção tátil da extremidade da

cânula. Após confirmação de que esta se encontra no local correto, deve ser realizada a deposição do sémen. Esta deposição deve ser lenta e controlada, por um período de cerca de cinco segundos (Kasimanickam 2021b).

Como já foi referido, existem outras técnicas que podem ser utilizadas para realizar a IA em bovinos. A técnica de inseminação intracornual profunda, ipsilateral ao ovário onde a ovulação irá ocorrer tem demonstrado ser uma opção, especialmente quando a dose seminal tem uma menor concentração de espermatozoides ou é de menor qualidade (Kasimanickam 2021b), pois com esta técnica o sémen é depositado mais próximo do local onde a fecundação irá ocorrer, reduzindo-se o percurso dos espermatozoides para alcançarem o oócito, o que favorece o número de espermatozoides na ampola tubária. Esta técnica demonstrou produzir resultados semelhantes ou melhores que as IA no corpo do útero. Um ensaio realizado em 2012 demonstrou que, comparando os dois locais de deposição de sémen já referidos, e com recurso a doses seminais de baixa concentração, a deposição intracornual profunda registou uma taxa de gestação superior em cerca de 19%, relativamente à taxa de gestação obtida com a técnica de IA no corpo uterino (Meirelles et al. 2012). Contudo, num outro trabalho publicado em 2013, os autores não encontraram diferenças significativas, quer nas taxas de fertilização, quer na qualidade dos embriões obtidos de vacas superovuladas, quando se comparou os dois métodos de IA acima descritos (Carvalho et al. 2013).

3.3.1.2. O inseminador

O inseminador constitui uma variável de extrema importância para o sucesso da IA. Este técnico é uma pessoa que está intimamente envolvida no processo, visto que é o responsável por diferentes etapas do mesmo, o que significa que a sua influência não deva ser ignorada. Ele deve ter no seu arsenal de conhecimentos, os fundamentos técnicos que lhe permitam realizar uma IA com sucesso, incluindo os referentes à técnica que vai utilizar, a anatomia da fêmea, bem como supervisionar eficazmente o armazenamento das palhinhas de sémen que vão ser utilizadas e, como manipular a dose seminal, preparar e montar a cânula de IA (Kasimanickam 2021b). Ao longo dos tempos, vários estudos demonstraram que existem alguns fatores que influenciam o desempenho do inseminador. Um trabalho de 2009 compilou a informação retirada de alguns desses estudos, salientando a importância da escolha do melhor técnico possível para uma dada exploração (Russi et al. 2009). Trabalhos de Cembrowicz (1964) e Miller (1991), citados por Russi et al. (2009), demonstraram que o estado de espírito e a personalidade do inseminador têm influência no sucesso da IA. Naqueles trabalhos chegou-se à conclusão de que profissionais que demonstrem algum nível de stress ou

preocupação têm resultados menos satisfatórios que os inseminadores mais tranquilos. Vários estudos indicam, também, que a confiança do inseminador é algo a ter em conta, isto é, o inseminador deve confiar na técnica que utiliza, de modo a ter melhores resultados, sendo que Russi (2008), citado por Russi et al. (2009), reportou uma diferença de quatro pontos percentuais nas taxas de gestação obtidas por inseminadores que acreditavam ou não, na técnica utilizada (40% vs 36%, respetivamente) e, foi ainda demonstrado por Umland (1983), citado por Russi et al. (2009), que a confiança na qualidade do sémen utilizado também constitui um elemento importante para uma IA de sucesso. O conhecimento e a prática do inseminador afetam igualmente, os resultados obtidos. A necessidade de os inseminadores terem acesso a um treino qualificado, ministrado por uma identidade competente, revelou-se ser algo imperioso, e os trabalhos realizados por Lamount e Foulkes (1981) e Schermerhorn et al. (1986), citados por Russi et al. (2009), demonstraram que vários parâmetros reprodutivos se deterioraram quando se comparou o trabalho realizado por inseminadores profissionais com o de inseminadores com menos qualificações e treino. É assim fundamental para uma exploração de bovinos ter um inseminador que esteja capacitado para realizar a IA, que coloque em prática os seus conhecimentos e os atualize periodicamente, que esteja atento aos pormenores e que tenha uma boa ética de trabalho e sentido de responsabilidade, para que as possibilidades de sucesso na IA sejam maximizadas (Russi et al. 2009; Kasimanickam 2021b).

3.3.1.3. O sémen utilizado

As características e a qualidade do sémen utilizado são de extrema importância na IA, para possibilitar uma conseqüente fecundação de qualidade. Posto isto, é necessária uma análise cuidada da origem, da preparação e do armazenamento do sémen. Como já referido anteriormente, a IA é a técnica reprodutiva mais utilizada no mundo inteiro, a par da criopreservação de sémen (Sathe 2021). Este é um método que apresenta as suas desvantagens, registadas num estudo onde se verificou que, com uma dose seminal de dois milhões de espermatozoides vivos, os resultados obtidos em termos de fertilidade foram significativamente menos favoráveis com o sémen criopreservado, quando comparados com o sémen fresco, o que demonstra que há algum grau de lesão dos gâmetas masculinos no processo de congelação-descongelação. Outra desvantagem referida neste estudo foi a diferença observada entre touros, levando os autores a concluir que cada touro responde de forma diferente ao processo de criopreservação (Shannon and Vishwanath 1995). Contudo, estas desvantagens são facilmente suplantadas pelos benefícios da utilização deste tipo de sémen, pois ele permite uma distribuição a nível mundial do sémen de um dado touro,

com uma maior segurança, possibilitando assim um melhoramento genético a um ritmo muito superior ao conseguido com a utilização da monta natural ou com o sémen fresco. Para além disso, o rápido progresso genético é conseguido através do aproveitamento máximo de touros com características superiores, que podem ser explorados mais eficientemente, podendo conseguir-se cerca de sessenta mil doses anuais de sémen por reprodutor, distribuídas mundialmente através da criopreservação (Curry 2000).

3.3.1.3.1. Touro

A obtenção de um ejaculado de qualidade começa pela seleção de um touro de interesse genético que seja competente a nível reprodutivo. Para tal, todos os touros utilizados para fins reprodutivos devem ser sujeitos a um exame andrológico. Este é um exame que permite, a um preço razoável, obter um espetro de informações de forma a reduzir o risco que, tanto o dono do touro, como os potenciais compradores e o veterinário correm ao selecionar um touro para reprodução. No entanto, este exame concorre apenas para a redução e não para a eliminação total do risco inerente, uma vez que o sucesso reprodutivo de um touro é atingido através de um conjunto de variáveis que incluem outros aspetos, tais como o maneio e o ambiente a que o touro está sujeito (Chenoweth 2015). Sucintamente, um exame andrológico é composto por quatro elementos principais, onde se incluem a realização de um exame físico que avalia o estado de saúde global do reprodutor, bem como os órgãos reprodutivos acessíveis pré-palpação transretal, uma avaliação reprodutiva, que averigua o estado dos órgãos reprodutivos do macho e que inclui a medição da circunferência escrotal, um parâmetro importante para a avaliação da qualidade espermática, a recolha do ejaculado e a sua consequente avaliação em termos da vitalidade, motilidade, a morfologia dos espermatozoides e a concentração espermática e, por fim, a elaboração de um relatório que enumera e descreve os resultados obtidos e estabelece um prognóstico. Outros testes podem ser incluídos, tais como a avaliação da libido e da capacidade de cópula e a realização de testes para a pesquisa de agentes patogénicos do foro reprodutivo (Chenoweth 2015). O exame andrológico tem demonstrado ser um elemento-chave para a avaliação da potencial fertilidade dos touros. Num trabalho de Chenoweth (2000) citado em Chenoweth (2015), realizado nos Estados Unidos, touros classificados como satisfatórios, questionáveis ou insatisfatórios obtiveram, com base no exame andrológico, taxas de gestação de 75%, 52% e 12%, respetivamente, demonstrando a importância deste exame.

O exame andrológico pode ainda ser, uma excelente forma de melhorar uma exploração a nível económico. Um trabalho realizado em 2011 que comparou duas explorações de bovinos de carne muito parecidas, em que uma utilizou touros não

avaliados e, a outra, touros avaliados andrológicamente, concluiu que esta última melhorou o seu nível de produção de vitelos em 31%, ou seja, aumentou em 13,8 vitelos/touro/ano e 24kg vitelo/vaca/ano, em comparação com a outra exploração que utilizava touros não avaliados. Isto traduziu-se num rácio custo-benefício de 1:36, tendo em conta o investimento no exame andrológico (Menegassi et al. 2011).

3.3.1.3.2. Sémen convencional

A utilização de sémen criopreservado na IA de bovinos é uma prática comum em todo o mundo, mesmo considerando a quebra da fertilidade do sémen criopreservado, relativamente ao sémen fresco ou refrigerado (Sathe 2021). Isto resulta da capacidade natural que os espermatozoides dos bovinos têm de resistir ao processo de congelação e descongelação, quando comparados com os espermatozoides de algumas outras espécies domésticas, o que permite atingir uma fertilidade aceitável com um menor número de espermatozoides por dose (Medeiros et al. 2002). Contudo, mesmo sendo estes espermatozoides mais resistentes que os de outras espécies, após o processamento, congelação, armazenamento e descongelação para a IA, apenas 50% dos espermatozoides sobrevivem e são móveis e, mesmo dentro deste grupo, alguns apresentam lesões ou alterações que diminuem a possibilidade de fertilizarem com sucesso o óócito ovulado (Hammerstedt et al. 1990). Os espermatozoides são expostos a condições *in vitro* hostis (diluição do plasma seminal, baixas temperaturas e meios hipertónicos) que conduzem a alterações na membrana celular destas células, semelhantes às que ocorrem durante o processo de capacitação no trato reprodutor feminino, facto que leva a uma redução do seu tempo de vida útil, quando são depositados no útero da fêmea (Medeiros et al. 2002). Estas alterações têm sido minimizadas com os progressos das técnicas de criopreservação, que incluem o recurso a diluidores que permitem uma melhor proteção dos espermatozoides, e que têm por função ser fonte de nutrientes e energia, ter um efeito tampão, assegurar que a pressão osmótica seja compatível, impedir o desenvolvimento bacteriano e evitar o choque térmico que pode ser provocado por este processo através do uso de crioprotetores, que minimizam o stress químico e físico, aquando da refrigeração e congelação (Sathe 2021).

3.3.1.3.3. Sémen sexado

O sémen sexado é uma inovação relativamente recente no mercado, sendo que apenas em 1989 foi obtida a primeira ninhada de coelhos, com este tipo de sémen (Johnson et al. 1989). Esta é uma nova tecnologia que permite, com um elevado grau

de certeza, selecionar o sexo da descendência. Para conseguir tal feito, o sémen é processado de forma a separar os espermatozóides portadores do cromossoma X, dos portadores do cromossoma Y. Para isso, recorre-se à citometria de fluxo, que não sofreu grandes alterações desde os primórdios da produção de sémen sexado e continua até hoje a ser o processo mais largamente utilizado para a sexagem espermática. Este método, denominado de Beltsville Sperm Sexing Technology, foi utilizado pela empresa XY, Inc, posteriormente adquirida pela Sexing Technologies (Novasota, TX, USA), que continua a desenvolver a técnica, consiste na utilização de um corante vital que tingem seletivamente o ácido desoxirribonucleico (ADN) presente no núcleo dos espermatozoides. De seguida, as células são mantidas em fila única, num fluxo que é estimulado por um raio laser, provocando a fluorescência do ADN, o que permite analisar a quantidade relativa de fluorescência e a consequente atribuição de uma carga elétrica a cada uma das células. A diferença na quantidade relativa de fluorescência de cada espermatozoide deve-se à diferença da quantidade de ADN presente nos dois tipos de cromossomas sexuais, sendo que o cromossoma X apresenta em média mais 4,2% de material genético que o cromossoma Y, fazendo com que os espermatozoides portadores de um cromossoma X emitam uma quantidade de fluorescência superior aos portadores do cromossoma Y. Deste modo, a técnica permite a separação entre espermatozoides masculinos e femininos com base na sua carga elétrica (Kasimanickam 2021c).

Este novo método apresenta claras vantagens para os produtores, que podem selecionar o sexo dos animais que pretendem. Apesar de implicar um maior investimento na aquisição do sémen e inseminação da fêmea, comparativamente à inseminação com sémen não sexado, esta tecnologia traz um maior retorno financeiro ao produtor visto que eles conseguem reduzir os custos necessários à obtenção das fêmeas de substituição, uma vez que a grande maioria dos partos vai dar origem a fêmeas e, vão ainda ter menos custos associados ao nascimento de machos indesejáveis (Kasimanickam 2021c). O sémen sexado possui, contudo, alguns pontos menos positivos devido ao efeito de todas as etapas a que o sémen é sujeito, que resulta numa redução da fertilidade do sémen sexado, comparativamente ao convencional.

As lesões provocadas nos espermatozoides durante o processamento podem ser resumidas em alguns pontos. O primeiro diz respeito à elevada pressão a que são sujeitos para que sejam orientados em fila única de forma a passarem pelo bucal de injeção; depois, está identificado o processo de coloração do ADN da célula com o Hoechst 33342, que possui propriedades mutagénicas que potenciam as alterações celulares; em terceiro, o facto de o sémen ser exposto à radiação ultravioleta e repetidamente exposto a campos e correntes elétricas e, para além disso, na fase de

separação dos espermatozoides pela sua carga elétrica, eles são sujeitos a um grau de stress elevado; para terminar, durante todo o processamento, há lugar à produção de espécies reativas de oxigénio, que têm uma ação danosa sobre as células (Maxwell et al. 1998; Klinc and Rath 2007). Num ensaio realizado nos Estados Unidos, em que se estudaram as taxas de gestação ao primeiro serviço em novilhas Holstein utilizando sémen sexado, foi obtida uma taxa de gestação de 47%. Este valor equivale a 80% da taxa de gestação obtida em explorações semelhantes usando-se sémen convencional, pelo que se concluiu que a taxa de gestação após IA com sémen sexado será sempre inferior à do sémen convencional (DeJarnette et al. 2009).

Novas estratégias para contrariar a redução de fertilidade provocada pelo processo de sexagem têm sido implementadas nas empresas que produzem este tipo de sémen. O exemplo mais representativo é o da Sexing Technologies, que criou o SexedULTRA 4M que já beneficia dos melhoramentos efetuados, como é o caso dos produtos utilizados no processo de congelação do sémen que permitem que os espermatozoides sejam menos lesados, em comparação com a metodologia da XY Inc (Kasimanickam 2021c). O que diferencia este novo produto dos da geração anterior é o aumento da concentração de espermatozoides de dois milhões para quatro milhões por palhinha de sémen sexado criopreservado, como forma de tentar colmatar o problema da sua menor fertilidade. Os seus efeitos foram registados num estudo onde foi obtida uma fertilidade média superior em 4,5 pontos percentuais com o sémen SexedULTRA 4M, em comparação com o sémen da XY Inc (Lenz et al. 2017).

Um outro processo, Sexcel™, foi desenvolvido pela empresa ABS, e consiste em corar seletivamente os espermatozoides. No entanto, ao invés de separar os dois tipos diferentes, faz-se a decapitação dos espermatozoides que não possuem o cromossoma sexual desejado, mantendo-se viáveis apenas aqueles cujo cromossoma sexual interessa (Burnell 2019). Um ensaio estudou esta metodologia e registou uma taxa de gestação de 52%, enquanto que com o sémen convencional se obteve uma taxa de gestação de 67%. Concluiu-se também que o aumento do número de “debris” celulares presentes na dose seminal assim obtida, não afetou de forma significativa os resultados obtidos (Perry et al. 2020).

Assim, as recomendações para a utilização do sémen sexado baseiam-se na sua utilização em explorações que tenham taxas de gestação por IA com sémen convencional acima dos 60% (Kasimanickam 2021c). Esta condição traduz o conhecimento, as boas práticas de trabalho e a experiência do inseminador, assim como a utilização de fêmeas saudáveis e em boa condição corporal, dando-se preferência às novilhas que revelem reflexo de imobilização e, mesmo estas quando em situação de retorno ao cio, deverão ser inseminadas com sémen convencional (Kasimanickam

2021c). Apesar de a utilização de sêmen sexado em programas de sincronização com IATF ser comercialmente atrativa, continua a recomendar-se o sêmen sexado para as fêmeas que demonstrem sinais de estro, visto que as taxas de gestação obtidas com fêmeas que o não fazem, são reduzidas (Sá Filho et al. 2012).

3.3.2. Fatores condicionadores ligados à fêmea

Para que os níveis de fertilidade desejados numa exploração sejam atingidos, é necessário que as fêmeas que são utilizadas possuam determinadas características favoráveis.

3.3.2.1. Número de partos

A influência do número de partos de uma vaca na sua performance reprodutiva tem sido debatida por vários autores, demonstrando que este é um tema complexo com muitas variáveis que podem afetar o resultado final. Um trabalho realizado em 2013, concluiu que as vacas de segunda lactação revelavam uma taxa de concepção superior à das primíparas, quando sujeitas a um protocolo de sincronização de ovulações – 60% e 58%, respetivamente, e que, a partir da terceira lactação esse valor reduzia-se significativamente, para 32% (Bayril and Yilmaz 2013). Contudo, outros ensaios apontam para uma maior taxa de concepção em primíparas que nas múltiparas, quando sujeitas a protocolos de sincronização. Tenhagen et al (2004) referiram que as vacas primíparas tratadas com o Ovsynch tinham uma taxa de concepção superior a vacas múltiparas – 37,9% e 31,6%, respetivamente (Tenhagen et al. 2004). Para além disso, também em 2019 um trabalho realizado com vacas Frísias Holstein constatou que as primíparas alcançavam melhores resultados de fertilidade utilizando protocolos de sincronização que as vacas múltiparas (Fodor et al. 2019). Vários autores tentaram explicar o porquê destes resultados, como por exemplo, Burns et al (2010) que compilaram estudos que demonstraram que, com um maior número de partos, ocorrem alterações no ambiente uterino que podem explicar a diminuição da fertilidade nas vacas. Os autores atribuíram a causa a possíveis alterações no aparelho reprodutor como a formação de aderências, a obstrução do oviduto e/ou inflamações das paredes uterinas, bem como a alterações hormonais que podem levar à ovulação de oócitos anormais, tal como uma concentração de P₄ exagerada, antes do estro, nas vacas múltiparas (Burns et al. 2010). Outra razão, de carácter anatómico, é sugerida por Veberckmoes et al (2004) citados por (Burns et al. 2010), que referem que o aumento do tamanho do útero de vacas com maior número de gestações leva a que seja mais difícil para os espermatozoides alcançar o oócito, do que acontece com as fêmeas com

um útero com dimensões mais reduzidas. Por outro lado, um outro trabalho refere que as vacas tendem a ter um primeiro parto com uma maior probabilidade de ser distócico e com problemas no período puerperal, o que pode provocar lesões que demoram mais tempo a recuperar na sua totalidade. Tal facto teria como consequência a possibilidade de as primíparas não se encontrarem totalmente recuperadas quando sujeitas à primeira IA pós-parto, o que explicaria essa quebra da fertilidade dessas fêmeas, registada em alguns trabalhos (De Kruif 1978). Um estudo realizado em 2004 concluiu ainda que existe uma diferença a nível endócrino no período peri-parto e pós-parto, quando são comparadas vacas primíparas e múltíparas, o que poderá suportar a premissa da diminuição da fertilidade das primíparas. Neste estudo, as vacas primíparas demonstraram ter, para além de uma menor CC que as múltíparas, uma menor concentração de IGF-1 e de Leptina e uma maior concentração de NEFAS, o que faz com que a sua recuperação do BEN seja mais prolongada e difícil, conduzindo a um maior intervalo parto-conceção (Meikle et al. 2004).

3.3.2.2. Intervalo pós-parto

Como já abordado no capítulo 3.1.1.4, o intervalo entre partos é um indicador importante para a avaliação da performance reprodutiva de uma vacaria. Como tal, o intervalo entre o parto e a primeira IA é bastante relevante para o sucesso da mesma.

De modo a tentar agrupar as fêmeas dentro da vacaria, é estabelecido um período voluntário de espera, que pode ser manipulado. Um trabalho realizado em 2021, avaliou as diferenças nas vertentes económica e reprodutiva, entre um período voluntário de espera de 60 dias ou de 88 dias. Neste estudo, concluiu-se que um aumento do período voluntário de espera era mais benéfico em vacas primíparas, uma vez que se obteve um aumento da taxa de gestação de 46,2% para 55%, quando o intervalo aumentou, o que permitiu um aumento do lucro com estas vacas devido principalmente a uma redução dos custos com as fêmeas de substituição. Em oposição, as vacas múltíparas não beneficiaram deste aumento. A sua taxa de gestação não revelou qualquer uma variação significativa entre os dois intervalos de tempo propostos, e o alongamento do tempo poderia levar a uma redução da rentabilidade económica deste tipo de vacas, uma vez que os custos de substituição poderiam aumentar, levando a uma diminuição da relação custo-benefício entre a alimentação e o lucro gerado (Giordano 2021).

3.3.3. A IA e a detecção do cio

Para as explorações de bovinos que não utilizam programas de sincronização de ovulações para IATF, a detecção do comportamento de cio é de extrema importância para que uma fêmea seja inseminada com sucesso, uma vez que a baixa eficácia da detecção do comportamento de cio é uma das maiores causas de uma reduzida performance reprodutiva, conduzindo a perdas económicas significativas. A baixa eficiência na detecção do cio pode levar a que não seja detetada a vaca se encontra em cio, o que resulta que a mesma não seja inseminada ou, por outro lado, que seja detetada erradamente em cio e inseminada fora do tempo correto (Senger 1994). A detecção do cio é afetada por um conjunto de fatores que passam pelo erro humano, isto é, quando a pessoa que está a fazer a detecção não conhece os sinais de cio ou não sabe o valor relativo de cada um deles, ou ainda quando não o faz as vezes suficientes e com a duração adequada. Outros fatores de ineficácia do processo de detecção do cio incluem o uso incorreto ou o não uso de meios auxiliares de detecção, o clima, o stress, as infraestruturas onde os animais estão a alojados, a produção leiteira, a raça, o estado endócrino da vaca (período pós-parto e protocolos hormonais), a condição corporal e de saúde do animal, o número de partos ou a presença ou não de um macho (Palomares 2021).

Para a detecção visual do cio, existem certas normas que devem ser seguidas. A pessoa a quem é atribuída essa responsabilidade deve possuir treino e experiência prévios, para conseguir identificar os sinais de cio. Isto inclui, quer os sinais mais exuberantes, como o reflexo de imobilização ao ser montada, quer os sinais secundários, que podem ser mais difíceis de detetar, como a presença de corrimento vaginal, o aumento da atividade física ou o edema vulvar. Esta observação deve ser feita a um grupo de vacas que se encontre na sua rotina normal num piso que não seja escorregadio. Um dos pontos mais importantes é o tempo necessário para realizar esta tarefa, visto que o número e a duração das observações fazem variar significativamente, a eficácia da detecção. Os valores de detecção de cio por observação visual são normalmente superiores quando ela é realizada, pelo menos duas vezes ao dia, durante pelo menos meia hora por período (Palomares 2021). Alguns equipamentos foram criados para auxiliar na detecção do comportamento de cio e que, apesar de não substituírem a observação visual, alertam para um aumento da atividade locomotora ou ajudam a identificar as fêmeas que foram montadas.

Após a detecção do cio, é necessário realizar-se a IA, que deve ocorrer segundo a regra AM-PM, isto é, após a detecção do comportamento de cio, a fêmea deve ser inseminada 8 a 12 horas depois. Sabe-se que as vacas irão ovular entre as 24 e as 32

horas depois de começarem a exibir comportamento de cio, pelo que ao inseminar-se segundo a regra AM-PM, quando o cio é detetado no seu início, permitir-se-á a capacitação dos espermatozoides no trato reprodutor feminino e a consequente fertilização do oócito (Palomares 2021). Caso a inseminação seja feita muito tardiamente, a taxa de gestação reduzir-se-á, visto que não haverá tempo para a capacitação dos espermatozoides, previamente ao envelhecimento do oócito. Um trabalho de campo de 2004 demonstrou uma redução da taxa de gestação de 66,2%, quando a inseminação foi realizada entre 8 e 18 horas, após a deteção do cio, para 45,4%, quando o foi mais de 30 horas depois (Martinez et al. 2004).

4. Trabalho Experimental

4.1. Introdução

Sabe-se que o sucesso de uma exploração leiteira depende em grande parte do sucesso reprodutivo da mesma (Cardoso Consentini et al. 2021), sendo que esse sucesso equivale a uma maior produção leiteira, que se traduz numa maior fonte de rendimento para o produtor (Santos et al. 2010). Para tal, é necessário garantir que as vacas mantenham a produção de leite no seu potencial máximo, o que obriga a que cada uma delas tenham um parto a cada 365 dias.

Como referido anteriormente, realizar uma IA de forma a obter um intervalo entre-partos de um ano, constitui um desafio que envolve muitas variáveis diferentes. Com base nesta premissa, procurou-se analisar vários fatores que poderiam ter influência no sucesso da primeira IATF, realizada após o último parto em vacas leiteiras e, no sucesso da primeira IA realizada em novilhas leiteiras. Relativamente às vacas, foram analisados os seguintes fatores: o número de partos, o touro dador do sémen, a condição corporal no início do protocolo de sincronização, o inseminador, a ocorrência de patologia no puerpério e o intervalo entre o parto e a IA. Nas novilhas, foram avaliados os seguintes parâmetros: a idade da novilha, o touro dador do sémen, o inseminador e a utilização ou não de protocolo hormonal de indução/sincronização de cios.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Recolha dos dados e dimensão da amostra

O presente trabalho experimental foi suportado com os dados recolhidos durante o período compreendido entre janeiro de 2022 e janeiro de 2023, tendo sido registadas informações sobre um total de 234 vacas leiteiras da raça Frísia Holstein e 50 novilhas da mesma raça. Deste grupo de fêmeas, 31 vacas e 7 novilhas foram eliminadas em virtude da impossibilidade da realização do exame de diagnóstico de gestação. Acresce

ainda referir a utilização de apenas 193 vacas para o estudo da variável touro dador de sémen, visto que as restantes 10 foram inseminadas com outros machos sem uma representação significativa e, igualmente, a utilização de apenas 42 novilhas para o estudo do fator inseminador no resultado final da primeira IA, também pela pouca representação de um outro inseminador.

Todas as fêmeas incluídas neste estudo foram sujeitas a exames ginecológicos antes do início dos tratamentos de indução/sincronização da ovulação ou do início da deteção do cio natural, de forma a assegurar que se encontravam cíclicas e sem nenhum tipo de patologia reprodutiva que pudesse adulterar os resultados da IA. As 203 vacas foram sujeitas a um protocolo hormonal de indução/sincronização da ovulação, ao passo que, no caso das novilhas, 83,7% (36/43) delas foram inseminadas após deteção de cio natural, enquanto que os restantes 16,3% (7/43) foram tratados com um protocolo hormonal e, subsequentemente, inseminadas.

A técnica de IA utilizada em todas as fêmeas foi a inseminação com deposição do sémen no corpo uterino, sendo que nas vacas foi utilizado sémen criopreservado convencional de três origens diferentes (A; B; C): o sémen A era composto por doses seminais heteroespérmicas de 3 touros da raça Aberdeen-Angus e foi utilizado em 46,6% (90/193) das inseminações; o B provinha de um macho Limousine e foi utilizado em 31,1% (60/193) das inseminações; e por último, o C provinha de um touro Aberdeen-Angus e foi utilizado em 22,3% (43/193) das inseminações. Já nas novilhas foi utilizado sémen criopreservado sexado da gama SexedULTRA 4M, contendo cerca de 4×10^6 espermatozoides, de três touros diferentes (D; E; F) todos da raça Holstein Frísia, sendo que o sémen do touro D foi utilizado em 39,5% (17/43) dos casos, o sémen do touro E foi utilizado em 41,9% (18/43) das inseminações e, nas restantes IA, foi utilizado sémen do touro F, 18,6% (8/42).

Quanto aos inseminadores, nas vacas foram recolhidos os registos de 3 técnicos de inseminação – A, B e C – sendo todos eles residentes. O técnico C por ter um menor grau de experiência, executou apenas 7,9% (16/203) das IA, enquanto que o técnico A, o mais experiente, efetuou 34% das inseminações (69/203) e o técnico B, 58,1% (118/203). Nas novilhas, apenas os técnicos A e B (os mesmos das IA nas vacas), foram os utilizados, executando o técnico A, 78,6% (33/42) das IA e o técnico B, 21,4% (9/42).

Foram recolhidas informações sobre características ligadas às fêmeas utilizadas, sobretudo aquelas que poderiam ter alguma influência na taxa de conceção da exploração. As novilhas utilizadas neste trabalho experimental tinham uma idade compreendida entre os 13 e os 16 meses e a idade mais prevalente foi a de 14 meses (24/43). As novilhas foram agrupadas em 2 classes diferentes: a primeira dos 13 aos 14

meses com 72,1% (31/43) das fêmeas; e a segunda, dos 15 aos 16 meses com 27,9% (12/43) das novilhas.

Em relação ao número de partos de cada vaca, os animais associados a este estudo apresentaram uma distribuição entre 1 parto (mínimo) e os 8 partos (máximo), sendo que a moda foi vacas primíparas, com 68 incluídas nesse grupo e, em média na amostra recolhida, as vacas tinham 2,39 partos. De forma a melhor poder avaliar a influência deste fator e avaliar se poderia haver diferenças entre vacas primíparas e múltíparas, essas fêmeas foram agrupadas em três classes distintas – 1 parto (A), 2 partos (B) e 3 ou mais partos (C) – e obteve-se a distribuição que pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência e percentagem de vacas por cada classe de número de partos

Número de partos em classes		
	Frequência	Percentagem (%)
A	68	33,5
B	54	26,6
C	81	39,9
Total	203	100

A condição corporal (CC) das vacas foi registada no momento do exame ginecológico que antecedeu o início do protocolo hormonal de sincronização da ovulação e foi usada uma escala de 1 a 5, sendo o 1, extremamente magra e o 5, obesa, e a classificação foi sempre da responsabilidade de um mesmo técnico. A classificação da CC de cada vaca na amostra recolhida teve a pontuação 2 como mínimo, e como máximo, a pontuação 4. Foi registada uma moda da classificação 3, sendo a média muito perto desse valor (2,93). Depois de serem classificadas as vacas, os animais foram divididos em 4 classes distintas: vacas com menos de 2,5 de CC, vacas com uma CC igual ou superior a 2,5, mas inferior a 3, vacas com uma CC igual ou superior a 3, mas inferior a 3,5 e, por fim, vacas com uma CC igual ou superior a 3,5. As diferentes classes apresentaram as frequências e percentagens que são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Frequência e percentagem de animais observados em cada classe de condição corporal

CC em classes		
	Frequência	Percentagem (%)
<2,5	8	3,9
≥2,5 - <3	76	37,4
≥3 - <3,5	103	50,7
≥3,5	16	7,9
Total	203	100

Foi registado o intervalo, em dias, entre o parto e a primeira IA de cada vaca, tendo o intervalo variado entre 74 e 493 dias. Apesar do grande intervalo, a média foi

cerca de 82 dias (81,89) e, o intervalo mais recorrente foi de 76 dias. As vacas eram examinadas pelo médico-veterinário da exploração entre o dia 48 e 51 após o parto, de forma a verificar se as mesmas já se encontravam em condições para iniciarem a atividade reprodutiva e, caso não fossem aprovadas no exame ginecológico, eram de novo avaliadas uma semana depois.

Para esta análise, as vacas foram colocadas em dois grupos conforme o intervalo parto-inseminação, de modo a facilitar a interpretação dos resultados, mas preservando a relevância em termos científicos: o primeiro grupo foi composto por vacas em que o intervalo foi igual ou inferior a 80 dias e incluiu 155 fêmeas (76,4%) e, o segundo grupo constituído por vacas com um intervalo parto-primeira IA superior a 80 dias, que incluiu 48 fêmeas (23,6%). Foi determinado como limite o intervalo de 80 dias visto que corresponde ao limite máximo para que uma vaca fique gestante e consiga obter um parto a cada 365 dias.

Por fim, foi ainda registada a existência de alguma afeção ou patologia que tenha ocorrido no período de puerpério, de forma a verificar se teria alguma influência na taxa de gestação. No que diz respeito a esta variável, foi registado o dia pós-parto em que se identificou a tal afeção ou patologia e qual o diagnóstico. Assim, foram registadas 22 vacas com algum tipo de patologia, sendo que 19 tinham metrite, que foi diagnosticada até aos 21 dias após o parto, duas vacas abortaram (uma aos 56 dias de gestação e outra aos 237 dias) e, uma vaca foi diagnosticada com cervicite aos 19 dias pós-parto.

4.2.2. Caracterização da exploração

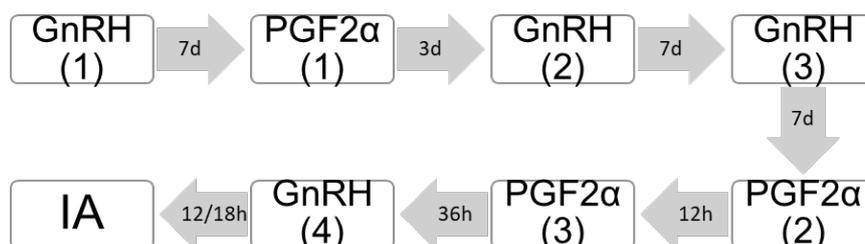
Neste estudo, os dados utilizados foram recolhidos na da Herdade Vale de Cardeiros (J.Thymm, Lda.) localizada na freguesia de Seda, concelho de Alter do Chão, distrito de Portalegre. Trata-se de uma exploração com um efetivo bovino leiteiro e um outro de carne, tendo sido utilizado para este trabalho, apenas o efetivo de leite, que conta com cerca de 400 fêmeas da raça Frísia Holstein criadas em regime intensivo. É uma exploração de alta produção leiteira com um regime de três ordenhas diárias. As vacas eram alimentadas com um alimento composto acompanhado com feno-silagem de milho como fonte de fibra, e estavam distribuídas por cinco parques onde se alojam as fêmeas em produção efetiva (distribuídas por idade e pelo nível produtivo), os vitleiros e parques destinados às vitelas de diferentes idades e outros animais em diferentes alturas do seu ciclo produtivo. Nomeadamente, a exploração tem um parque para as novilhas, um cercado para animais mais novos que ainda não iniciaram a sua vida reprodutora, um cercado onde estão alojadas as novilhas gestantes, um cercado para as vacas no período seco, um parque pré-parto/maternidade e um parque de pós-parto recente.

4.2.3. Maneio reprodutivo

Após a certificação de que as novilhas já possuíam um ciclo ovário normal, elas eram separadas em dois grupos: por um lado, novilhas que iriam ser inseminadas após a detecção de um cio natural; e por outro, aquelas em que se iria recorrer a protocolo hormonal de sincronização de ovulação com IATF. Às novilhas que foram alocadas no grupo da detecção de cio foi-lhes proporcionado um equipamento de detecção de cio, GEA CowScout (GEA, Alemanha), que funciona como auxiliar de detecção de cio, emitindo alertas no sistema informático da exploração para a possibilidade de uma fêmea se encontrar em cio com base na sua atividade locomotora, mais especificamente pelos movimentos do pescoço. Após a detecção do cio, as novilhas foram inseminadas seguindo a regra AM-PM. As novilhas colocadas no segundo grupo foram sujeitas ao protocolo hormonal Co-Synch-5, que se iniciou num dia aleatório do ciclo ovário (dia 0) com uma administração IM de 10 µg de um análogo da GnRH (acetato de buserelina, Receptal®, MSD Animal Health, Portugal) e introdução de um CIDR (1,38g de P₄, Zoetis Portugal, Lda). O CIDR foi posteriormente removido no dia 5, com uma administração IM de 500 µg de um análogo de PGF_{2α} (Cloprostenol sódico, Cyclix Bovinos, Virbac, França). Uma segunda administração de 500 µg do mesmo análogo da PGF_{2α} foi efetuada 12 horas depois da primeira e, por fim, 72 horas após a primeira administração de PGF_{2α} realizou-se a IATF, conjuntamente com uma administração de 10 µg de um análogo da GnRH (Receptal®, MSD Animal Health, Portugal).

Quanto às vacas, o protocolo utilizado em todas elas foi o Double-Ovsynch. Assim, após a realização do exame ginecológico foi iniciado o protocolo (dia 0) com uma injeção IM de 10 µg de um análogo da GnRH (acetato de buserelina, Receptal®, MSD Animal Health, Portugal). Sete dias depois, houve lugar a uma injeção IM de 500 µg de um análogo de PGF_{2α} (Cloprostenol sódico, Cyclix Bovinos, Virbac, França), seguida de uma segunda injeção de 10 µg do análogo da GnRH (Receptal®, MSD Animal Health, Portugal) três dias depois. Após um intervalo de sete dias, foi administrada uma terceira injeção de 10 µg do mesmo análogo da GnRH e, passados mais sete dias, a segunda administração de 500 µg do análogo da PGF_{2α}, com outra administração 12 horas depois. Por fim, 36 horas após a terceira injeção do análogo da PGF_{2α}, administrou-se a última injeção de 10 µg do análogo da GnRH, com a IA a ocorrer entre 12 e 18 horas depois desta última. Este protocolo está ilustrado no Esquema 1.

Esquema 1: Protocolo de sincronização Double Ovsynch utilizado nas vacas



O diagnóstico de gestação foi realizado pelo médico-veterinário assistente, aos 33 dias, por ecografia transretal.

4.2.4. Análise estatística

Para a recolha de dados, foi criada uma base de dados no programa Microsoft Office Excel® 2016. Esses dados foram depois exportados para o programa IBM SPSS Statistics® 26.0, onde foi realizada a análise estatística necessária para a interpretação dos dados.

A análise preliminar dos dados baseou-se na realização de uma análise de estatística descritiva, em que foram avaliadas as frequências, percentagens, médias e modas, das diferentes variáveis. De seguida, foram criadas as tabelas de contingência onde foi aplicado o teste de qui-quadrado de Pearson, de forma a avaliar a significância da relação entre as variáveis e a variável dependente. Neste caso, foi avaliada a significância de diferentes variáveis com a variável que identificava o resultado do diagnóstico de gestação. Estabeleceu-se que o nível de significância era de 5%, o que se traduz num de *p-value* igual a 0,05, pelo que qualquer *p-value* abaixo deste valor resultante do teste de significância demonstraria uma evidência estatística para rejeitar a hipótese nula, hipótese nula esta que é a inexistência de uma relação entre a variável em teste e o diagnóstico de gestação. Nas variáveis que apresentaram interação com o diagnóstico de gestação, foi desenvolvida uma nova tabela de contingência com aplicação do teste de qui-quadrado de Pearson de modo a averiguar se a diferença entre classes nas quais os dados estavam agrupados dentro de uma determinada variável era estatisticamente significativa, sendo que foi mais uma vez utilizado o nível de significância de 5%. Nestas últimas variáveis foi ainda calculado o coeficiente de contingência, de forma a quantificar a força da associação entre as variáveis em estudo e o resultado do diagnóstico de gestação, variando este coeficiente entre 0 (sem associação) e 1 (associação perfeita). Por fim, foi ainda realizada uma regressão logística binária para relacionar a variável onde estava representado o número de partos e a variável diagnóstico de gestação.

5. Resultados e discussão

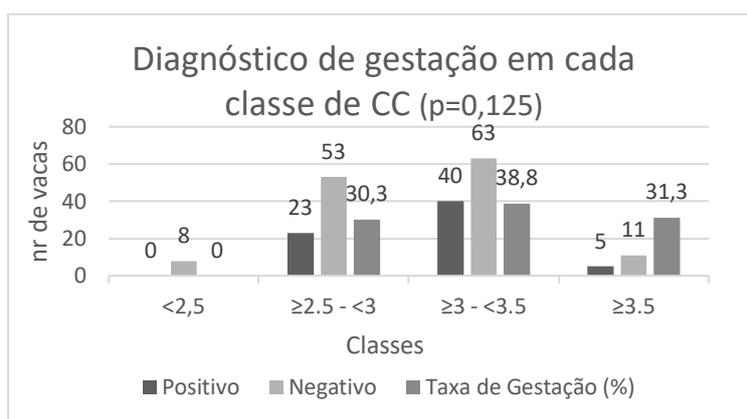
5.1. Estudo realizado com as vacas

No caso do estudo das 203 vacas, um total de 33,5% (68/203) revelou um diagnóstico de gestação positivo aos 33 dias após a IA. Este valor quantificou a taxa de gestação global das vacas inseminadas após terem sido sujeitas ao protocolo Double-Ovsynch, pela primeira vez desde o último parto. Estudos já publicados apontam para alguma variação nas médias obtidas conforme a composição das amostras trabalhadas. Contudo, os valores mais usuais variaram entre os 35% e os 50% (Souza et al. 2008; Herlihy et al. 2012; Astiz and Fargas 2013). Assim, o resultado obtido no presente estudo fica um pouco abaixo dos valores registados em investigações prévias, sendo ainda assim um valor próximo do esperado deste protocolo, numa vacaria de alta produção leiteira.

Quanto à variável que avaliou a condição corporal das vacas antes da execução do protocolo de sincronização, obtiveram-se os resultados patentes no Gráfico 1. O valor mais elevado de vacas gestantes aos 33 dias após a IATF ocorreu na classe das vacas com CC maior ou igual a 3 e menor que 3,5, onde 38,8% (40/103) das vacas ficaram gestantes, sendo que a classe com a pior taxa de gestação foi a das vacas com CC menor que 2,5, em que nenhuma fêmea ficou gestante (0/8).

Contudo, ao se analisar estatisticamente a relação entre a CC e o diagnóstico de gestação, não se pode rejeitar a hipótese nula de que a CC não afeta a taxa de gestação, uma vez que se obteve um valor de p igual a 0,125.

Gráfico 1: Resultados dos diagnósticos de gestação obtidos por classe de CC

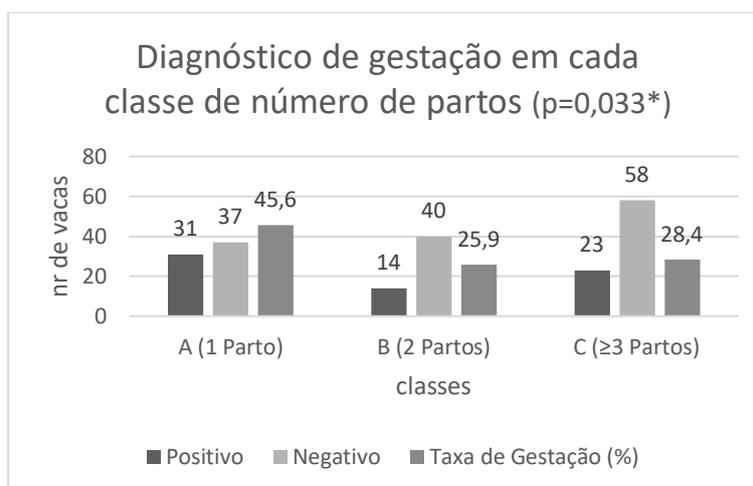


Os resultados obtidos acentuam a importância de manter as vacas numa boa CC de forma a serem atingidos os objetivos reprodutivos da exploração e que esta é uma boa base para a avaliação do estado nutricional dos animais, visto que, apesar desta variável não ter sido estatisticamente significativa quanto ao diagnóstico de

gestação, é de salientar que os melhores resultados foram obtidos com as vacas que revelaram uma CC média com valores entre o 3 e o 3,5. Esta classe representa os animais que apresentam um estado nutricional equilibrado, onde as suas necessidades nutricionais são satisfeitas, mas não há um excesso de aporte alimentar que provoque um excessivo acumular de gordura. No mesmo sentido, quanto mais perto dos extremos da classificação, quer superior, quer inferior, os resultados são visivelmente piores, atingindo-se os resultados mais negativos, principalmente em animais considerados magros, em que apesar da presente amostragem ter sido diminuta, nenhuma vaca ficou gestante após a IATF. Os resultados agora obtidos estão em concordância com o referido por Short e Adams (1988), que advogaram que a vaca põe as funções reprodutivas em segundo plano quando não se encontra num estado de equilíbrio nutricional, despendendo a sua energia para as atividades vitais. Adicionalmente, uma explicação para os maus resultados com as vacas de CC muito elevada, poderá ser o resultado de um aumento da insulina plasmática por via de uma alimentação com valores nutricionais superiores às necessidades do animal. Um trabalho de 2010 demonstrou que, à semelhança do que acontecia em humanos e ratos, nos bovinos existia uma diminuição da qualidade do oócito e do desenvolvimento embrionário nas vacas em situação de hiperinsulinémia e com um aumento da taxa de ácidos gordos em circulação. Apesar de se saber que a insulina e o IGF-1 promovem o crescimento folicular pela interação com as gonadotrofinas, foi demonstrado que um excesso desses fatores levava a uma redução da qualidade final do oócito (Sinclair 2010).

Ao ser avaliada a variável número de partos por vaca e a sua influência na taxa de gestação, foram obtidos os resultados apresentados no Gráfico 2. É de salientar que as primíparas foram as fêmeas que registaram a melhor taxa de gestação aos 33 dias, com 45,6% (31/68), enquanto que as restantes classes de vacas múltiparas apresentaram valores semelhantes entre si: na classe B foi obtida uma taxa de gestação de 25,9% (14/54) e na classe C esse valor foi de 28,4% (23/81). A relação entre o número de partos de cada vaca e a taxa de gestação demonstrou ser estatisticamente significativa ($p=0,033$), o que permite rejeitar a hipótese nula que o número de partos não têm influência na taxa de gestação. Constatou-se ainda existirem diferenças estatisticamente significativas entre as classes, com um valor de $p=0,033$.

Gráfico 2: Resultados dos diagnósticos de gestação obtidos por classe de número de partos



(*) demonstra que esta é uma análise com significância estatística

Após a realização de um teste de contingência, o valor do coeficiente obtido foi de 0,180, relevando que existe uma relação fraca entre a variável correspondente ao número de partos e a variável dependente. Ao realizar uma regressão logística binária foi atingido um coeficiente B de -0,377 e um valor de *odds ratio* de 0,686. Estes resultados demonstram que, à medida que o número de partos aumenta, há uma redução da possibilidade de se obter um diagnóstico de gestação positivo. Mais especificamente, ao se analisar o *odds ratio* obtido, pode concluir-se que a cada unidade de aumento no número de partos, ou seja, ao se transitar de uma classe com vacas com menos partos para uma outra com mais, há uma diminuição de 31,4% (100-68,6) na probabilidade de se obter um resultado positivo no diagnóstico de gestação.

Ao serem analisados os resultados alcançados neste trabalho experimental verificou-se que, em concordância com o que Tenhagen et al (2004) e Fodor et al (2019) referiram nos seus trabalhos, as primíparas registaram uma taxa de gestação superior à das múltiparas, com uma diferença significativa de 15%, em favor das primeiras. Contudo, é de notar que não se registou um decréscimo da taxa de gestação com o aumento do número de partos, nas vacas múltiparas (Classe B x Classe C), como foi reportado por Bayril e Yilmaz (2013). Pelo contrário, existiu um aumento de 2,5% da taxa de gestação nas vacas com mais de três partos, comparativamente com as vacas com dois partos. Estes resultados podem ser reflexo do cuidado nutricional e da promoção do bem-estar animal praticados nesta exploração, onde as vacas eram separadas por grupos que tinham em conta fatores como o seu nível produtivo e a idade, de forma a homogeneizar as fêmeas pelos vários parques, sendo assim, mais fácil ter um manejo adequado a cada grupo de animais, permitindo assim alcançar bons

resultados reprodutivos, mesmo com as vacas mais velhas e com um maior número de partos.

No que diz respeito à variável existência ou não de alguma patologia ou afeção no período do puerpério, obteve-se uma percentagem de 22,7% (5/22) de taxa de gestação nas vacas com um puerpério anormal, em contraste com os 34,8% (63/181) das vacas com um puerpério normal. Com base no teste de qui-quadrado de Pearson, não foram encontradas evidências para a rejeição da hipótese nula de que a existência de um puerpério anormal não teria influência na taxa de gestação, tendo sido o *valor de p* associado igual a 0,257. Apesar de estatisticamente não ser uma interação significativa, é de salientar a diferença numérica de 12,1% entre as vacas com um puerpério normal, e as com um anormal. Apesar da monitorização e terapêutica imediata, aquando da identificação destas patologias, registou-se um menor número destas vacas com um diagnóstico de gestação positivo. Uma possível explicação para estes resultados assenta na possibilidade da existência de lesões da parede uterina provocadas por partos distócicos ou abortos, situações que prolongam o tempo necessário para que a fêmea apresente um ambiente uterino compatível com uma normal eficiência reprodutiva (Djuricic et al. 2012). A presença de LPS e de PMN no útero destas vacas, como já foi reportado na revisão da literatura, pode provocar um atraso ao retorno da atividade ovárica cíclica (Sheldon et al. 2009; Dourey et al. 2011). Este atraso pode levar a que, durante o período voluntário de espera normal, não ocorram ciclos suficientes para que seja atingido um nível de fertilidade considerado aceitável (Bruinjé et al. 2017).

Ao ser analisado o intervalo de tempo parto-1ª IA, verificou-se que vacas com um intervalo igual ou inferior a 80 dias registaram uma taxa de gestação de 33,5% (52/155), e as vacas com um intervalo superior a 80 dias, 33,3% (16/48). Após a realização do teste de qui-quadrado de Pearson, obteve-se um *valor de p* igual a 0,978, não tendo sido, por isso, possível rejeitar a hipótese nula que o intervalo de tempo parto-1ª IA não teria influência na taxa de gestação aos 33 dias. Tal como foi comprovado no estudo de Ma et al (2022), o alongamento do intervalo parto-1ª IA demonstrou ser algo benéfico para uma vacaria visto que conduzia a uma melhoria dos índices de fertilidade. Contudo, os resultados obtidos na presente análise demonstraram que nesta vacaria não havia qualquer tipo de benefício em prolongar o intervalo parto-1ª IA para além dos 80 dias. Ao evitar que as IA sejam realizadas após o dia 80, assegura-se que um maior número de vacas tenha um intervalo entre partos de cerca de 365 dias, levando a que os custos com a aquisição de fêmeas de substituição seja mais reduzido, como foi demonstrado no trabalho de Giordano (2021) que concluiu que apenas era economicamente viável o aumento do intervalo parto-1ª IA nas vacas se esta medida

trouzer para a exploração uma melhoria significativa dos valores da fertilidade em comparação com os resultados obtidos em intervalos parto-1ª IA mais curtos.

A influência do touro cujo sémen foi utilizado na IA na taxa de gestação foi igualmente alvo de análise. Ao estudarem-se os touros A, B e C, obtiveram-se taxas de gestação de 24,4% (22/90), 41,7% (25/60) e 41,9% (18/43), respectivamente. Com base no *valor de p* de 0,040, foi encontrada uma evidência estatística para a rejeição da hipótese nula e poder afirmar-se que o touro utilizado tem influência na taxa de gestação aos 33 dias. Tendo esta relação um coeficiente de contingência de 0,180, é possível afirmar-se que existe uma relação fraca entre a variável em estudo e a variável dependente. Os resultados obtidos nesta análise vêm reforçar ainda mais a importância de uma correta seleção dos touros a utilizar, de forma a aumentar as hipóteses de sucesso reprodutivo de uma vacaria. A análise destes dados revelou que um dos touros utilizados (Touro A) teve uma taxa de gestação quase 20% inferior aos restantes 2. Este resultado pode advir de várias causas subjacentes, sendo que a mais provável passa pela variabilidade da resposta dos vários touros à criopreservação do seu sémen, uma vez que existem touros cujos espermatozoides suportam melhor o processo de congelação-descongelação, que outros. Esta afirmação é apoiada pelos estudos de Holt (2000) e de Thurston et al. (2002), que concluíram que, apesar de a técnica da criopreservação de sémen estar já amplamente difundida e estudada em diferentes espécies, em todas elas existem fatores individuais que fazem com que exista uma variação entre indivíduos em resposta a todo o processo congelação-descongelação. Estes fatores são muitas vezes codificados geneticamente, sendo para isso necessária a realização de testes genéticos para identificar as diferenças entre os indivíduos (Holt 2000; Thurston et al. 2002). Uma hipótese menos provável, mas que poderá igualmente justificar estes resultados, está relacionada com a adequação do armazenamento e do manuseio das palhinhas de sémen utilizadas. No entanto, é um fator identificado como sendo o menos provável causador destas diferenças, visto que todo o sémen estava armazenado no mesmo contentor e foi manuseado sempre pelos mesmos técnicos.

Por último, foi analisada a influência do inseminador na subsequente taxa de gestação aos 33 dias. O inseminador A conseguiu uma taxa de gestação à 1ª IA de 33,3% (23/69), enquanto o B registou uma de 29,7% (35/118) e o C, atingiu os 62,5% (10/16). O valor de significância obtido na relação entre esta variável e a variável dependente foi de 0,033 e, por isso, foi rejeitada a hipótese nula de que o inseminador não teria influência na taxa de gestação aos 33 dias da 1ª IA. Esta relação é fraca, visto ter sido alcançado um valor de coeficiente de contingência de 0,180. Estes resultados vêm reforçar a importância do inseminador para o sucesso da IA, existindo uma variação significativa entre os diferentes técnicos. Seria de esperar, tendo em conta os trabalhos

de Lamount e Foulkes (1981) e de Schermerhorn et al. (1986), citados por Russi et al. (2009), que o inseminador C, por ter tido uma formação mais recente, e por isso, menor experiência, viesse a revelar menor eficiência que os seus colegas mais antigos. No entanto, ele apresentou resultados bastante elevados, registando uma taxa de gestação quase duas vezes superior à dos outros dois. Porém, o seu registo pode ser eventualmente explicado pelo reduzido número de vacas que ele inseminou, comparativamente com os outros dois técnicos (A e B).

5.2. Estudo realizado com as novilhas

Nesta análise experimental, um total de 43 novilhas foram acompanhadas, tendo sido obtida taxa de gestação global à 1ª IA com sémen sexado de 46,5% (20/43), ao diagnóstico de gestação aos 33 dias. Este é um resultado que fica um pouco aquém dos obtidos noutros trabalhos que também consideraram o recurso ao sémen sexado, neste tipo de fêmeas. Cerchiaro et al (2007) e Maicas et al (2019) reportaram taxas de gestação superiores a 50%, em concordância com as conclusões de Burnell (2019) que referiu, com base na sua experiência pessoal e nos dados recolhidos, que as vacarias tendem a ter uma taxa de gestação superior a 50% com as novilhas (Cerchiaro et al. 2007; Burnell 2019; Maicas et al. 2019). Contudo, apesar do valor registado neste trabalho não ter sido ótimo, é semelhante aos referidos em vários outros trabalhos já realizados, com novilhas e com sémen sexado, pelo que pode ser considerado um resultado aceitável.

Como foi referido anteriormente, parte destas fêmeas foram sujeitas a um protocolo hormonal de sincronização de ovulação e IATF, enquanto as restantes o foram inseminadas após a deteção do cio natural. Após a análise desta variável, verificou-se que as novilhas sujeitas ao protocolo hormonal obtiveram uma taxa de gestação de 42,9% (3/7), enquanto que as que foram inseminadas após a deteção de um cio natural registaram uma taxa de gestação de 47,2% (17/36). Ao ser analisada a relação entre a utilização ou não do protocolo hormonal e a taxa de gestação à 1ª IA, não foi encontrada qualquer relação estatisticamente significativa, com um *valor de p* de 0,832, o que não permite rejeitar a hipótese nula, levando à conclusão que o resultado obtido no diagnóstico de gestação não foi influenciado pelo facto das novilhas terem sido expostas a um protocolo hormonal de sincronização de ovulação e IATF ou se por outro lado, foram inseminadas após deteção de cio natural. Apesar de o número de novilhas sujeitas ao protocolo de Co-Synch 5 ter sido bastante mais reduzido que o das restantes fêmeas beneficiadas após a deteção do cio natural e, do facto de estatisticamente os resultados obtidos nestes dois grupos não terem influenciado significativamente a taxa de gestação, foi registada uma redução numérica de mais de quatro pontos percentuais

na percentagem de diagnósticos positivos de novilhas que foram tratadas com o protocolo hormonal comparativamente com as o que não foram. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Colazo e Mapletoft (2017), que obtiveram uma redução de quase dois pontos percentuais quando compararam a IATF com a IA após deteção de cio natural (Colazo and Mapletoft 2017). Com base nos resultados agora obtidos e nas recomendações atualmente em vigor que condicionam o recurso aos tratamentos hormonais, a utilização deste tipo de protocolos de sincronização associados à utilização de sémen sexado não parece ser relevante, nas condições do presente trabalho.

Relativamente à idade das novilhas, os resultados obtidos associados a esta variável, mostraram que as que foram inseminadas com uma idade entre os 13 e os 14 meses tiveram uma taxa de gestação de 51,6% (16/31), enquanto que o grupo das novilhas mais velhas registaram uma de 33,3% (4/12). Após a análise estatística da relação entre esta variável e a variável dependente, ela revelou-se sem significância, com um *valor p* de 0,281. Esta variável tem uma elevada importância para uma vacaria de leite, uma vez que, ao reduzir-se a idade a que uma novilha fica gestante e consequentemente tem o primeiro parto, o período não produtivo destes animais é igualmente reduzido. Isto permite ao produtor obter um retorno económico numa fase mais precoce do ciclo de vida do animal e, ainda, reduzir os custos associados à sua recria. Wathes et al. (2014) referem que muitos produtores apontam para que as novilhas tenham o primeiro parto aos 24 meses, o que implica que estas fiquem gestantes aos 15 meses de idade. Aqueles autores defendem ainda que, para que tal aconteça, o maneio e a alimentação devem ser de elevada qualidade, de forma a garantir que as novilhas tenham um desenvolvimento correto quando postas à reprodução. Contudo, argumentam também, que estes objetivos são raramente atingidos, sendo que normalmente a idade ao primeiro parto varia entre os 26 e os 30 meses de idade, o que significa que estas fêmeas apenas ficam gestantes entre os 17 e os 21 meses (Wathes et al. 2014). Na presente análise, ainda que a idade das novilhas não tenha significância estatística no sucesso da IA, é de notar que mais de 50% dos animais com idades de 13 ou 14 meses ficaram gestantes. É de notar que estes resultados se encontram dentro do intervalo que Burnell (2019) refere como sendo os valores normais de fertilidade com sémen sexado em novilhas, o que demonstra a qualidade do trabalho efetuado na recria e IA destas fêmeas, na exploração em causa, permitindo que as gestantes tenham o seu primeiro parto, caso levem a gestação até ao seu término, entre os 22 e os 23 meses. Os resultados obtidos com as novilhas de 15 ou 16 meses foram numericamente piores que os registados nas mais novas. Este cenário poderá ser explicado pelo facto de as novilhas mais velhas terem sido

beneficiadas mais tarde que as outras, por terem tido um desenvolvimento corporal mais lento e não se encontrarem nas condições necessárias para iniciarem a sua vida reprodutiva e, eventualmente, esse seu subdesenvolvimento, ao longo de um dado período da recria, possa ter influenciado a fertilidade à IA do grupo.

Foi também analisada a influência do touro dador do sémen na taxa de gestação das novilhas. Primeiramente, foi registada a percentagem de sucesso de cada macho, tendo o touro D revelado uma taxa de gestação de 64,7% (11/17), o touro E de 33,3% (6/18) e o touro F, de 37,5% (3/8) de diagnósticos positivos. Ao ser analisada esta relação através do teste de qui-quadrado de Pearson, foi obtido um *valor de p* de 0,151, que não permite rejeitar a hipótese nula relativa a variável touro. Apesar de, com esta análise, não ter sido possível demonstrar a significância da variável em termos estatísticos, é importante notar que, à semelhança do que aconteceu com as vacas, existe uma variação dos resultados obtidos com os diferentes touros. O touro D teve uma taxa de sucesso de 64,7% (11/17), contrastando com os restantes dois, que não atingiram sequer, os 39%. Visto que o sémen era proveniente do mesmo centro de recolha e exportação de sémen bovino, isto é, o material genético dos três touros, agora utilizado, foi recolhido e processado da mesma forma, a explicação mais provável para os resultados obtidos passará eventualmente, pela variação individual de cada um dos reprodutores relativamente aos processos de sexagem do sémen e de criopreservação, defendida por Holt (2000) e Thurston et al. (2002), nos seus trabalhos.

Por último, foram analisados os resultados obtidos pelos inseminadores. O inseminador A registou uma taxa de gestação de 42,4% (14/33), enquanto que o inseminador B, uma de 66,7% (6/9). A relação entre esta variável e a variável dependente não foi estatisticamente significativa, com um *valor p* de 0,197, o que faz com que a hipótese nula que refere que o inseminador não tem influência na taxa de gestação não possa ser rejeitada. De salientar que o inseminador B apresentou um número de IA bastante inferior ao do inseminador A, razão pela qual esta relação pode não ter sido estatisticamente significativa. Isto deveu-se ao facto de o inseminador A ser o técnico com mais experiência e, por isso, supostamente mais bem preparado para a execução da IA com sémen sexado, uma vez que cada dose de sémen tem um custo bastante elevado. Estes são aspetos que foram abordados no trabalho de Russi et al. (2009), que enuncia que a confiança do inseminador, quer nas suas capacidades quer na técnica ou material utilizado, é algo importante para assegurar o sucesso de uma IA (Russi et al. 2009), porém, o tamanho e o desequilíbrio da amostra analisada, podem ter afetado os resultados agora apresentados.

6. Conclusão

Em modo de conclusão, no presente trabalho apenas alguns fatores foram identificados como influenciadores estatísticos da eficácia da IA no presente estudo que envolveu nas 203 vacas, nomeadamente, o número de partos de cada vaca, o touro dador do sémen e o inseminador. Na análise da influência do número de partos, identificou-se uma tendência decrescente no que concerne à probabilidade de a vaca ficar gestante à medida que o número de partos aumenta. Quanto a análise da influência do touro concluiu-se, em conformidade com a literatura já publicada, que ainda são necessários mais estudos para melhor analisar e identificar as possíveis variações individuais de cada macho que fazem com que o sémen tenha diferentes respostas ao processo de criopreservação. Quanto ao inseminador, este é um elemento que influencia os resultados obtidos sendo por isso importante que este seja alguém com conhecimento e experiência na área para que as hipóteses de sucesso da IA sejam as mais altas possíveis.

Nesta mesma análise com as vacas, existiram outros fatores que não demonstraram significância estatística no sucesso da IA, tais como a existência ou não de um puerpério saudável, ou o intervalo de tempo parto-1^a IA, ou ainda, a condição corporal no momento do início do protocolo hormonal de indução/sincronização da ovulação. Ainda assim, é necessário referir certas tendências encontradas nestas análises, na interação entre um puerpério saudável ou não e o sucesso da IA, onde é perceptível uma descida da taxa de gestação nas vacas que tiveram alguma doença ou afeção durante esse período. Adicionalmente, é de salientar a interação entre a condição corporal no momento do início do protocolo hormonal e o sucesso da IA, uma vez que foi identificada a importância de se assegurar uma condição corporal perto do meio da tabela de classificação para que se fossem os melhores resultados, sendo de evitar os extremos da classificação, principalmente o extremo inferior.

No estudo realizado com as 43 novilhas, não foram identificados fatores com significância estatística que comprovasse a sua influência no sucesso da IA. Porém, mais uma vez, à semelhança do que aconteceu com as vacas, foram identificadas tendências que devem ser tidas em consideração. Na comparação entre novilhas que foram sujeitas ao protocolo hormonal Co-Synch 5 e as que só foram beneficiadas após a deteção de cio natural, considerando-se o recurso ao do sémen sexado, foi identificada uma tendência para uma diminuição da taxa de gestação nas novilhas tratadas. Similarmente com o relatado no estudo das vacas, ainda que não estatisticamente significativas, foram identificadas diferenças numéricas na taxa de

sucesso da IA entre os touros cujo sémen sexado foi utilizado, bem como na dos inseminadores.

No que diz respeito às principais limitações deste trabalho, está patente um desequilíbrio do número de fêmeas em alguns dos grupos analisados, levando a que em algumas análises de variáveis, um grande número de animais se encontrasse num grupo, deixando os outros com um número reduzido de indivíduos, o que pode ter comprometido a significância estatística dos cálculos efetuados, com influência direta nos resultados obtidos e, nas conclusões daí retiradas. Para além disso, não podem ser excluídos outros fatores que não foram tidos em conta neste trabalho e que poderão ter afetado os resultados obtidos, nomeadamente as condições meteorológicas que podem provocar algum tipo de stress térmico às fêmeas, dado a vacaria do estudo estar localizada num local onde as temperaturas oscilam bastante ao longo do ano. Outro fator a mencionar é o intervalo de tempo entre a descongelação do sémen e a IA, havendo a possibilidade da quebra da eficácia da IA quando esse período é longo, por exposição dos espermatozoides a oscilações da temperatura e ao esgotamento das suas reservas energéticas.

Apesar de várias variáveis não terem sido consideradas estatisticamente significativas quando analisada a sua relação com a taxa de gestação aos 33 dias da 1ª IA, é possível serem retiradas e registadas algumas tendências de interações que estão de acordo com a literatura. Este trabalho pode assim, ser relevante para a futura investigação destes e de outros fatores que influenciam a fertilidade de bovinos de leite, contribuindo-se para a sua identificação e da forma como a afetam, matéria ainda muito debatida no mundo científico, e que é urgente compreender e dominar, para que a reprodução de bovinos de leite possa ser otimizada.

7. Bibliografia

- A. Palomares R. 2021. Estrus Detection. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 431–446.
- Astiz S, Fargas O. 2013. Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using Double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology*. 79(7):1065–1070. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.01.026.
- Atkins JA, Pohler KG, Smith MF. 2013. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 29(3):479–492. doi:10.1016/j.cvfa.2013.07.008.
- Austin EJ, Mihm M, Ryan MP, Williams DH, Roche JF. 1999. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J Anim Sci*. 77(8):2219–2226. doi:10.2527/1999.7782219X. [accessed 2023 May 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10462002/>.
- Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ. 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*. 151(5):2233–2243. doi:10.1210/en.2009-1190.
- Bayril T, Yilmaz O. 2013. Effect of timing of artificial insemination after synchronization of ovulation on reproductive performance in Holstein dairy cows. *Trop Anim Health Prod*. 45(2):411–416. doi:10.1007/s11250-012-0231-0.
- Berry DP, Friggens NC, Lucy M, Roche JR. 2016. Milk production and fertility in cattle. *Annu Rev Anim Biosci*. 4:269–290. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111406.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*. 69(7):843–851. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.011.
- Bruinjé TC, Colazo MG, Gobikrushanth M, Ambrose DJ. 2017. Relationships among early postpartum luteal activity, parity, and insemination outcomes based on in-line milk progesterone profiles in Canadian Holstein cows. *Theriogenology*. 100:32–41. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.05.021. [accessed 2023 Mar 29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28708531/>.
- Burnell M. 2019. The use of sexed semen in dairy herds. *Livestock*. 24(6):282–286. doi:10.12968/live.2019.24.6.282.
- Burns BM, Fordyce G, Holroyd RG. 2010. A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a calf—Implications for reproductive efficiency in northern Australia. *Anim Reprod Sci*. 122(1–2):1–22. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.010.
- Butler WR. 2003. Energy balance relationships with follicular development ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*. 83(2–3):211–218. doi:10.1016/S0301-6226(03)00112-X.

- Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE. 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J Anim Sci.* 65(3):645–650. doi:10.2527/JAS1987.653645X. [accessed 2023 Apr 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3667429/>.
- Cabrera VE. 2014. Economics of fertility in high-yielding dairy cows on confined TMR systems. *Animal.* 8(SUPPL. 1):211–221. doi:10.1017/S1751731114000512.
- Cain Dempsey A. 2021. Examination for Pregnancy: Biochemical Tests. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction.* 2nd ed. Wiley-Blackwell. p. 479–485.
- Cardoso Consentini CE, Wiltbank MC, Sartori R. 2021. Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. *Animals.* 11(2):1–30. doi:10.3390/ani11020301.
- Cardoso RC, Alves BRC, Prezotto LD, Thorson JF, Tedeschi LO, Keisler DH, Amstalden M, Williams GL. 2014. Reciprocal changes in leptin and NPY during nutritional acceleration of puberty in heifers. *J Endocrinol.* 223(3):289–298. doi:10.1530/JOE-14-0504. [accessed 2023 Mar 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326602/>.
- Cardoso RC, West SM, Maia TS, Alves BRC, Williams GL. 2020. Nutritional control of puberty in the bovine female: prenatal and early postnatal regulation of the neuroendocrine system. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724020300011>.
- Carvalho PD, Fuenzalida MJ, Ricci A, Souza AH, Barletta RV, Wiltbank MC, Fricke PM. 2015. Modifications to Ovsynch improve fertility during resynchronization: Evaluation of presynchronization with gonadotropin-releasing hormone 6 d before initiation of Ovsynch and addition of a second prostaglandin F_{2α} treatment. *J Dairy Sci.* 98(12):8741–8752. doi:10.3168/jds.2015-9719.
- Carvalho PD, Souza AH, Sartori R, Hackbart KS, Dresch AR, Vieira LM, Baruselli PS, Guenther JN, Fricke PM, Shaver RD, et al. 2013. Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers. *Theriogenology.* 80(9):1074–1081. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.008.
- Cerchiaro I, Cassandro M, Dal Zotto R, Carnier P, Gallo L. 2007. A Field Study on Fertility and Purity of Sex-Sorted Cattle Sperm. *J Dairy Sci.* 90(5):2538–2542. doi:10.3168/jds.2006-694.
- Chen J, Soede NM, van Dorland HA, Remmelink GJ, Bruckmaier RM, Kemp B, van Knegsel ATM. 2015. Relationship between metabolism and ovarian activity in dairy cows with different dry period lengths. *Theriogenology.* 84(8):1387–1396. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.07.025.
- Chenoweth P. 2015. Bull Health and Breeding Soundness. In: D. Cockcroft P, editor. *Bovine Medicine.* 3rd ed. John Wiley & Sons, L.t.d. p. 246–261.
- Christiansen D. 2021. Examination for Pregnancy: Rectal Palpation. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction.* 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 471–478.
- Colazo MG, Mapletoft RJ. 2017. Pregnancy per AI in Holstein heifers inseminated with sex-selected or conventional semen after estrus detection or timed-AI. *The Canadian Veterinary Journal.* 58(4):365–370.
- da Costa ANL, de Araujo AA, Valmir J. 2011. Particularities of Bovine Artificial Insemination. In: *Artificial Insemination in Farm Animals.* InTech. p. 153–166.

- Crowe MA, Padmanabhan V, Mihm M, Beitins IZ, Roche JF. 1998. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biol Reprod.* 58(6):1445–1450. doi:10.1095/BIOLREPROD58.6.1445. [accessed 2023 Apr 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9623604/>.
- Curry M. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 5(1):46–52. doi:10.1530/ror.0.0050046.
- Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, Zalesky D, Schanbacher B, Kittok R, Kinder J. 1984. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod.* 31(2):332–341. doi:10.1095/BIOLREPROD31.2.332. [accessed 2023 Mar 27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6478017/>.
- Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod.* 37(5):1054–1065. doi:10.1095/BIOLREPROD37.5.1054. [accessed 2023 Mar 27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2832005/>.
- DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology.* 71(1):49–58. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.042.
- Dirandeh E. 2014. Starting Ovsynch protocol on day 6 of first postpartum estrous cycle increased fertility in dairy cows by affecting ovarian response during heat stress. *Anim Reprod Sci.* 149(3–4):135–140. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.07.018.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1–2):211–228. doi:10.1016/S0739-7240(02)00158-3.
- Diskin MG, Kenny DA. 2016. Managing the reproductive performance of beef cows. *Theriogenology.* 86(1):379–387. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.052.
- Djuricic D, Vince S, Ablondi M, Dobranic T, Samardzija M. 2012. Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Anim Reprod Sci.* 134(3–4):119–124. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.08.023.
- Douglas GN, Overton TR, Bateman HG, Dann HM, Drackley JK. 2006. Prepartal Plane of Nutrition, Regardless of Dietary Energy Source, Affects Periparturient Metabolism and Dry Matter Intake in Holstein Cows. *J Dairy Sci.* 89(6):2141–2157. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(06)72285-8.
- Dourey A, Colazo MG, Barajas PP, Ambrose DJ. 2011. Relationships between endometrial cytology and interval to first ovulation, and pregnancy in postpartum dairy cows in a single herd. *Res Vet Sci.* 91(3). doi:10.1016/J.RVSC.2010.11.011. [accessed 2023 Apr 17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21176928/>.
- Estill C. 2021. Initiation of Puberty in Heifers. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 258–268.

- Fodor I, Gábor G, Lang Z, Abonyi-Tóth Z, Ózsvári L. 2019. Relationship between reproductive management practices and fertility in primiparous and multiparous dairy cows. *Can J Vet Res.* 83(3):218–227.
- Footo RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *J Anim Sci.* 80(E-suppl_2):1–10. doi:10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a.
- Fricke PM, Ricci A, Giordano JO, Carvalho PD. 2016. Methods for and Implementation of Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice.* 32(1):165–180. doi:10.1016/j.cvfa.2015.09.006.
- García-Ruiz A, Cole JB, Vanraden PM, Wiggans GR, Ruiz-López FJ, Van Tassell CP. 2016. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. doi:10.15482/USDA.ADC/1256513. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.
- Giordano J, Fricke P. 2012. Accuracy of pregnancy diagnosis outcomes using transrectal ultrasonography 29 days after artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 95.
- Giordano JO. 2021. Impact of Voluntary Waiting Period and First-Service Management Strategies on the Reproductive Performance and Profitability of Dairy Cows Take Home Messages.
- Giordano JO, Wiltbank MC, Guenther JN, Pawlisch R, Bas S, Cunha AP, Fricke PM. 2012. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 95(2):639–653. doi:10.3168/jds.2011-4418.
- Gonzalez-Padilla E, Wiltbank JN, Niswender GD. 1975. Puberty in beef heifers. The interrelationship between pituitary, hypothalamic and ovarian hormones. *J Anim Sci.* 40(6):1091–1104. doi:10.2527/JAS1975.4061091X. [accessed 2023 Apr 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1095536/>.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J Androl.* 11(1):73–88. doi:https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>.
- Hansel W, Alila HW, Dowd JP, Milvae RA. 1991. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J Reprod Fertil Suppl.* 43:77–89.
- Holt WilliamV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 53(1):47–58. doi:10.1016/S0093-691X(99)00239-3.
- Honaramooz A, Aravindakshan J, Chandolia RK, Beard AP, Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC. 2004. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 80(1–2):15–29. doi:10.1016/S0378-4320(03)00136-2.
- Hunter MG. 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl.* 43:91–99. doi:10.1530/biosciproc.2.008. [accessed 2023 Apr 3]. <https://europepmc.org/article/med/1668836>.

- J. Ambrose D. 2021. Postpartum Anestrus and Its Management in Dairy Cattle. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 408–430.
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. 1989. Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/41/2/199/2930693>.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *Journal of Endocrinology*. 196(2):331–334. doi:10.1677/JOE-07-0504.
- Kasimanickam R. 2021a. Pharmacological Intervention of Estrous Cycles. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 458–470.
- Kasimanickam R. 2021b. Artificial Insemination. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 447–457.
- Kasimanickam R. 2021c. Utilization of Sex-Selected Semen. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 1000–1010.
- Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, Porteous R, Schütz G, Herbison AE. 2013. Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun*. 4. doi:10.1038/ncomms3492.
- Klinc P, Rath D. 2007. Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(1):63–67. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00730.x.
- Kohara J, Konnai S, Onuma M. 2006. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 54:25–30.
- De Kruif A. 1978. Factors influencing the fertility of a cattle population. *Reproduction*. 54(2):507–518. doi:10.1530/jrf.0.0540507.
- Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, Mason S, Erskine R, van der Meer F. 2021. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. *J Dairy Sci*. 104(6):6358–6375. doi:10.3168/JDS.2020-18925.
- Lane EA, Austin EJ, Crowe MA. 2008. Oestrous synchronisation in cattle--current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Anim Reprod Sci*. 109(1–4):1–16. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.08.009. [accessed 2023 May 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18786787/>.
- Lang-Ree JR, Vatn T, Kommisrud E, Løken T. 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet Rec*. 135(17):412–413. doi:10.1136/VR.135.17.412. [accessed 2023 Apr 21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7856036/>.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. 2010. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 151(8):3479–3489. doi:10.1210/en.2010-0022.

- Lenz RW, Gonzalez-Marin C, Gilligan TB, DeJarnette JM, Utt MD, Helser LA, Hasenpusch E, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R. 2017. 190 SexedULTRA™, A NEW METHOD OF PROCESSING SEX-SORTED BOVINE SPERM IMPROVES CONCEPTION RATES. *Reprod Fertil Dev.* 29(1):203. doi:10.1071/RDv29n1Ab190.
- Lucy MC. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci.* 83(7):1635–1647. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(00)75032-6. [accessed 2023 Apr 6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10908067/>.
- Lucy MC. 2001. ADSA foundation scholar award reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci.* 84(6):1277–1293. doi:10.3168/jds.s0022-0302(01)70158-0.
- Lucy MC. 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64:237–254. doi:10.5661/RDR-VI-237. [accessed 2023 Apr 6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17491151/>.
- Ma J, Burgers EEA, Kok A, Goselink RMA, Lam TJGM, Kemp B, van Kneegsel ATM. 2022. Consequences of extending the voluntary waiting period for insemination on reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 244. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2022.107046.
- Macmillan KL, Peterson AJ. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim Reprod Sci.* 33(1–4):1–25. doi:10.1016/0378-4320(93)90104-Y.
- Maicas C, Hutchinson IA, Kenneally J, Grant J, Cromie AR, Lonergan P, Butler ST. 2019. Fertility of fresh and frozen sex-sorted semen in dairy cows and heifers in seasonal-calving pasture-based herds. *J Dairy Sci.* 102(11):10530–10542. doi:10.3168/jds.2019-16740.
- Martinez F, Kaabi M, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, de Paz P, Anel L. 2004. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology.* 62(7):1264–1270. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.002.
- Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 10(5):433. doi:10.1071/RD98102.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 57(1):327–344. doi:10.1016/S0093-691X(01)00674-4.
- Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction.* 127(6):727–737. doi:10.1530/rep.1.00080.

- Meirelles C, Kozicki LE, Weiss RR, Segui MS, Souza A, Santos IW dos, Breda JC dos S. 2012. Comparison between deep intracornual artificial insemination (dIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 55(3):371–374. doi:10.1590/S1516-89132012000300006.
- Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Lampert V do N, Borges JBS, Peripolli V. 2011. Bioeconomic impact of bull breeding soundness examination in cow-calf systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 40(2):441–447. doi:10.1590/S1516-35982011000200028.
- Milvae RA. 1986. ROLE OF LUTEAL PROSTAGLANDINS IN THE CONTROL OF BOVINE CORPUS LUTEUM FUNCTIONS. *J Anim Sci*. 62(suppl_2):72–78. doi:10.1093/ansci/62.2.72.
- Nett TM. 1987. Function of the hypothalamic-hypophysial axis during the post-partum period in ewes and cows. *J Reprod Fertil Suppl*. 34:201–13.
- Nowicki A, Barański W, Baryczka A, Janowski T. 2017. OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds -an update. *Journal of Veterinary Research (Poland)*. 61(3):329–336. doi:10.1515/jvetres-2017-0043.
- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology*. 53(4):841–857. doi:10.1016/S0093-691X(00)00234-X. [accessed 2023 Apr 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10730974/>.
- Paisley LG, Duane Mickelsen W, Frost OL. 1978. A survey of the incidence of prenatal mortality in cattle following pregnancy diagnosis by rectal palpation. *Theriogenology*. 9(6):481–491. doi:10.1016/0093-691X(78)90113-9.
- Perry GA, Walker JA, Rich JJJ, Northrop EJ, Perkins SD, Beck EE, Sandbulte MD, Mokry FB. 2020. Influence of Sexcel™ (gender ablation technology) gender-ablated semen in fixed-time artificial insemination of beef cows and heifers. *Theriogenology*. 146:140–144. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.030.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. 1997. Reproductive Management of Lactating Dairy Cows Using Synchronization of Ovulation. *J Dairy Sci*. 80(2):301–306. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75938-1.
- Redmond JS, Macedo GG, Velez IC, Caraty A, LWilliams G, Amstalden M. 2011. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*. 141(4):541–548. doi:10.1530/REP-10-0467.
- Ribeiro E, Galvão K, Thatcher W, Santos J. 2012. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod*. 9:370–387.
- Richard Pursley J, Silcox RW, Wiltbank MC. 1998. Effect of Time of Artificial Insemination on Pregnancy Rates, Calving Rates, Pregnancy Loss, and Gender Ratio After Synchronization of Ovulation in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 81(8):2139–2144. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75790-X.
- Rizzo A, Ceci E, Guaricci AC, Sciorsci RL. 2019. Kisspeptin in the early post-partum of the dairy cow. *Reprod Domest Anim*. 54(2):195–198. doi:10.1111/RDA.13325. [accessed 2023 Apr 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30168873/>.

- Roa J, Herbison AE. 2012. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*. 153(11):5587–5599. doi:10.1210/EN.2012-1470. [accessed 2023 Apr 3]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948210/>.
- Robertson HA. 1974. CHANGES IN THE CONCENTRATION OF UNCONJUGATED OESTRONE, OESTRADIOL-17 α AND OESTRADIOL-17 β IN THE MATERNAL PLASMA OF THE PREGNANT COW IN RELATION TO THE INITIATION OF PARTURITION AND LACTATION. *Reproduction*. 36(1):1–7. doi:10.1530/JRF.0.0360001. [accessed 2023 Apr 18]. https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/36/1/jrf_36_1_001.xml.
- Romano JE, Pinedo P, Bryan K, Ramos RS, Solano KG, Merchan D, Velez J. 2017. Comparison between allantochorion membrane and amniotic sac detection by per rectal palpation for pregnancy diagnosis on pregnancy loss, calving rates, and abnormalities in newborn calves. *Theriogenology*. 90:219–227. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.11.004. [accessed 2023 Apr 21]. https://www.academia.edu/92807690/Comparison_between_allantochorion_membrane_and_amniotic_sac_detection_by_per_rectal_palpation_for_pregnancy_diagnosis_on_pregnancy_loss_calving_rates_and_abnormalities_in_newborn_calves.
- Romano JE, Thompson JA, Forrest DW, Westhusin ME, Tomaszewski MA, Kraemer DC. 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*. 66(4):1034–1041. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.02.044. [accessed 2023 May 2]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16584765/>.
- Ronnekleiv OK, Qiu J, Kelly MJ. 2019. Arcuate Kisspeptin Neurons Coordinate Reproductive Activities with Metabolism. *Semin Reprod Med*. 37(3):131–140. doi:10.1055/s-0039-3400251.
- Roy B, Ghosh S. 2015. Care and Management of Dry Cows. In: *Dairy Animal Production*. 1st ed. New India Publishing Agency. p. 53–62.
- Russi L dos S, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. 2009. Importância da capacitação de recursos humanos em programas de inseminação artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 33(1):26–33.
- Sá Filho MF, Girotto R, Abe EK, Penteadó L, Campos Filho EP, Moreno JF, Sala R V., Nichi M, Baruselli PS. 2012. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows1. *J Anim Sci*. 90(6):1816–1823. doi:10.2527/jas.2011-4523.
- Santos J, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. 2010. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. <http://www.census.gov/population/www/>.
- Santos JEP, Rutigliano HM, Filho MFS. 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 110(3–4):207–221. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.01.014. [accessed 2023 Apr 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18295986/>.
- Santos VG, Carvalho PD, Maia C, Carneiro B, Valenza A, Fricke PM. 2017. Fertility of lactating Holstein cows submitted to a Double-Ovsynch protocol and timed artificial insemination versus artificial insemination after synchronization of estrus at a similar day in milk range. *J Dairy Sci*. 100(10):8507–8517. doi:10.3168/jds.2017-13210.

- Sathe S. 2021. Cryopreservation of Semen. In: M. Hopper R, editor. *Bovine Reproduction*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 986–999.
- Say E, Çoban S, Nak Y, Nak D, Kara U, White S, Kasimanickam V, Kasimanickam R. 2016. Fertility of Holstein heifers after two doses of PGF2 α in 5-day CO-Synch progesterone-based synchronization protocol. *Theriogenology*. 86(4):988–993. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.026.
- Senger PL. 1994. The Estrus Detection Problem: New Concepts, Technologies, and Possibilities. *J Dairy Sci*. 77(9):2745–2753. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77217-9.
- Shannon P, Vishwanath R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci*. 39(1):1–10. doi:10.1016/0378-4320(95)01376-B.
- Sheldon I, Price S, Cronin J, Gilbert R, Gadsby J. 2009. Mechanisms of Infertility Associated with Clinical and Subclinical Endometritis in High Producing Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(SUPPL. 3):1–9. doi:10.1111/J.1439-0531.2009.01465.X. [accessed 2023 Apr 17]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2009.01465.x>.
- Sinclair KD. 2010. Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows: Developmental consequences for the oocyte and pre-implantation embryo. *Acta Sci Vet*.(38):545–557.
- Tenhagen B-A, Surholt R, Wittke M, Vogel C, Drillich M, Heuwieser W. 2004. Use of Ovsynch in dairy herds—differences between primiparous and multiparous cows. *Anim Reprod Sci*. 81(1–2):1–11. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.08.009.
- Thurston LM, Watson PF, Holt W V. 2002. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*. 23(4):255–62.
- Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J Anim Sci*. 73(10):3141. doi:10.2527/1995.73103141x.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. 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(6):1067–1078. doi:10.1016/S0093-691X(99)00195-8.
- W. Blowey R. 2016. The Cow at Calving. In: *The Veterinary Book for Dairy Farmers*. 4th ed. 5M Publishing Ltd. p. 135–178.
- Walsh RB, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J Dairy Sci*. 90(1):315–324. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(07)72632-2. [accessed 2023 Apr 18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17183099/>.
- Wathes DC, Pollott GE, Johnson KF, Richardson H, Cooke JS. 2014. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal*. 8:91–104. doi:10.1017/S1751731114000755.
- Weigel KA, VanRaden PM, Norman HD, Grosu H. 2017. A 100-Year Review: Methods and impact of genetic selection in dairy cattle—From daughter–dam comparisons to deep learning algorithms. *J Dairy Sci*. 100(12):10234–10250. doi:10.3168/jds.2017-12954.

- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*. 68(4):549–559. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.04.056.
- Williams GL, Alves BR, Cardoso RC. 2018. Female puberty: Nutrition and endocrinology. In: Skinner MK, editor. *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 3. 2nd ed. New York: Elsevier Science & Technology.
- Wiltbank MC, Pursley JR. 2014. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*. 81(1):170–185. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.017.