



Avaliação do emprego do eCG em um programa hormonal de indução/sincronização de estro e ovulação em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade

Evaluation of the use of eCG in at hormonal program for induction/synchronization of estrus and ovulation in 12- 14 months old beef heifers

J.F.M. Bragança^{1,4}, G.M. Bastos², J.F.C. Oliveira³, L.F.K. Borges¹, P.B.D. Gonçalves³

¹Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Xanxerê, SC, Brasil.

²Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, PR, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

⁴Correspondência: jose.braganca@unoesc.edu.br

Resumo

O presente estudo realizou uma avaliação acerca do efeito do tratamento com eCG e acetato de medroxiprogesterona (MAP) sobre a eficiência reprodutiva em novilhas de corte. Para tanto, em uma primeira etapa (pré-experimento), foram utilizadas 64 novilhas cruzadas (*Bos taurus x Bos indicus*), de 12 a 14 meses de idade, divididas ao acaso em dois grupos: eCG (n = 32) e controle (n = 32). Na segunda etapa, utilizou-se um número maior de fêmeas (n = 92) da mesma idade e padrão fenotípico, a fim de confirmar os resultados alcançados no grupo eCG. Fêmeas dos grupos-tratamento (eCG e confirmação), no dia zero (início do tratamento), receberam durante sete dias um pessário vaginal contendo 250 mg de MAP, junto a uma injeção intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (BE) na dose de 2,5 mg. Nas 24 h antes da retirada do pessário (dia 6), foram aplicados 104 µg de cloprostenol sódico, via submucosa vulvar, e uma injeção IM de 250UI de eCG. Após a retirada dos pessários (dia 7), as fêmeas tiveram seu estro controlado pelo período de 48 h, sendo inseminadas nas 12 h da sua manifestação. As fêmeas que não manifestaram estro nesse período receberam uma injeção IM de 100 µg de GnRH e, após 16-18 h, foram inseminadas sem observação dele (IATF). As fêmeas do grupo-controle receberam o mesmo tratamento hormonal anterior sem o emprego do eCG. Nas 48 h da retirada do MAP, 75,0% (24/32), 52,0% (48/92) e 40,6% (13/32) das fêmeas manifestaram estro nos grupos tratamento e controle, respectivamente, não mostrando diferença significativa. Em relação aos índices de concepção (eCG 50,0% (12/24); confirmação 60,4% (29/48)) e prenhez (eCG 46,9% (15/32); confirmação 45,6% (42/92)) nos grupos-tratamento, estes mostraram-se similares e, ao serem agrupados, foram significativamente superiores aos do grupo-controle (23,07% (3/13); 25,0% (8/32)), respectivamente (P < 0,05). Conclui-se que o emprego de eCG, associado ao MAP, permite melhorar os índices de prenhez em novilhas de 12 a 14 meses de idade.

Palavras-chaves: bovino, eCG, estro, inseminação artificial, sincronização, taxa de prenhez.

Abstract

*The present study evaluated the effect of eCG and medroxyprogesterone acetate (MAP) on the reproductive efficiency of beef heifers. Initially, a preliminary experiment comprehending sixty-four 12-14 months old crossbred (*Bos taurus x Bos indicus*) beef heifers randomly assigned to groups eCG (n = 32) and control (n=32) was performed. In a second moment, ninety-two heifers of same age and fenotipic background were used as a replicate of the first experiment to confirm the preliminary results. Animals from group eCG received an intravaginal sponge pessary containing MAP (250 mg) on day 0 (beginning of treatment) for 7 days, along with an intramuscular (IM) injection of estradiol benzoate (2.5 mg). Twenty-four hours before sponge withdrawal (day 6), cloprostenol sodium (104 µg) was injected in the vulvar submucosa along with an IM injection of eCG (250 IU). After sponge withdrawal on day 7 estrous detection was carried out for forty-eight hours, and animals were inseminated twelve hours after being observed in estrous. Animals which did not manifested estrous received an IM injection of GnRH (100 µg) and were inseminated 16-18 hours later without estrous detection. Animals in the control group were treated according to the same hormonal protocol used for group eCG except for the eCG injection which it was administered. At forty-eight hours after sponge withdrawal 75.0% (24/32), 52.0% (48/92) e 40.6% (13/32) of the animals were detected in estrous from treatment and control groups, respectively, without any significant difference among groups. Conception rates (preliminary experiment – (eCG 50.0% (12/24); replicate 60.4% (29/48)) and pregnancy rates (preliminary experiment 46.9% (15/32); replicate 45.6% (42/92)) in the treatment groups were similar between the two experiments. Data from both experiments were pooled and compared to control group (23.07% (3/13); 25.0% (8/32) indicating a significant improvement in conception and pregnancy rates, respectively (P < 0,05). We conclude that the use of eCG associated with MAP improves pregnancy rates of 12-14 months old beef heifers.*

Keywords: artificial insemination, bovine, eCG, estrus, pregnancy rate, synchronization.



Introdução

A pecuária de corte no Brasil, ou de maneira geral, é caracterizada por uma baixa eficiência produtiva e reprodutiva. A idade em que o animal atinge a puberdade (Schillo et al., 1992), a baixa taxa de natalidade e a idade elevada à primeira cria estão entre os principais fatores responsáveis por essa reduzida eficiência, tendo na nutrição e no manejo inadequados as principais causas (Gottschall, 1999).

Muitos são os fatores que influenciam a idade à puberdade na novilha de corte e, quando esta não é alcançada no início da estação de monta, compromete a fertilidade e a eficiência reprodutiva. Assim, tratamentos direcionados à indução da puberdade aumentam a eficiência reprodutiva, uma vez que permitem que as fêmeas completem seu primeiro estro subfértil antes do início da estação de monta. Essas novilhas, cobertas nessa época, irão parir no começo da estação de produção e, conseqüentemente, gerar terneiros mais pesados ao desmame e tendo mais tempo para restabelecerem suas reservas corporais no pós-parto (Rasby et al., 1998; Vogg et al., 2004).

Trabalhos experimentais têm demonstrado que o emprego de gestágenos induz ciclicidade em vacas em anestro (Smith et al., 1987; Fike et al., 1997) e a puberdade em novilhas (Short et al., 1976; Anderson et al., 1996). Em novilhas pré-púberes, a aplicação de progesterona e estradiol 17 β induz à formação de um corpo lúteo e à atividade cíclica (Gonzalez-Padilla et al., 1975). Da mesma forma, a associação de estrógenos a gestágenos seria útil para elevar a taxa de manifestação de estro e de prenhez em novilhas próximas da puberdade (Lammoglia et al., 1998; Rasby et al., 1998; Bridges et al., 1999).

Por outro lado, o eCG em novilhas estimula o crescimento folicular ovariano de maneira dose-dependente, prevenindo a atresia de alguns folículos não atrésicos e, inclusive, recuperando folículos atrésicos iniciais (Monniaux et al., 1984). Com essa finalidade, o eCG tem sido utilizado no momento da retirada do progestágeno para estimular o crescimento folicular (Bó et al., 2003). Trabalhos com vacas no pós-parto têm alcançado resultados significativamente superiores quando o eCG é aplicado 24 h da retirada do pessário vaginal em um sistema misto que inclui observação de estro e IATF (Maciel et al., 2001; Bastos et al., 2004).

Com base nesses resultados, a hipótese levantada no presente estudo é a de que a aplicação de eCG um dia antes da retirada do progestágeno em novilhas de corte pré-púberes e no início da puberdade (peripúberes) promoveria um maior crescimento folicular, permitindo a presença de um folículo com diâmetro capaz de responder ao pico pré-ovulatório de LH induzido pelo GnRH. Além disso, possibilitará a sincronização da ovulação para utilizar a IATF. Ainda, o progestágeno é importante para a atividade cíclica em fêmeas que ainda não a iniciaram.

Assim, o objetivo deste experimento foi verificar o efeito do eCG associado ao tratamento hormonal com acetato de medroxiprogesterona (MAP) sobre a eficiência reprodutiva de novilhas de corte, com idade de 12 a 14 meses.

Material e Métodos

Os ensaios experimentais foram executados em duas etapas. A primeira etapa foi conduzida em uma propriedade particular situada em Santa Flora, distrito do município de Santa Maria, localizado na região centro-oeste do estado do Rio Grande do Sul (latitude 29° 51' 02,48" e longitude 53° 46' 02,01"). Com base nos resultados obtidos neste experimento, foi implantada a segunda etapa, utilizando-se um número maior de fêmeas. Esta foi executada em uma propriedade no município de Rio Grande, na região sudoeste do estado (latitude 31° 46' 19" e longitude 52° 20' 33").

Para o primeiro experimento, foram utilizadas 64 novilhas mestiças (*Bos Taurus* x *Bos indicus*), com idade variando entre 12 e 14 meses, criadas em pastagens naturais de forma extensiva, divididas em dois grupos denominados eCG (n = 32) e controle (n = 32). Utilizando-se uma escala de 1 a 5 (1 magra e 5 gorda), foram selecionadas as novilhas em condição corporal (cc) 3 e peso vivo médio (pvm) de 298 (\pm 15) kg. Em um segundo experimento, foram utilizadas 92 novilhas para confirmar os resultados do grupo eCG. Neste último experimento, os animais eram também mestiços (com predomínio da raça Red Angus), com 12 a 14 meses de idade, criadas em condições similares do grupo anterior, e apresentando cc 3 e pvm de 280 (\pm 12) kg. Considerando que não houve diferença de prenhez entre os dois grupos-tratamento, os resultados foram agrupados e comparados com o grupo-controle.

As novilhas do grupo eCG receberam no dia zero (início do tratamento) um pessário vaginal contendo 250 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), durante sete dias, e uma injeção via intramuscular (IM) de 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE). No dia seis, foi aplicada uma dose de 104 μ g de cloprostenol sódico via submucosa vulvar (smv) e 250 UI de eCG IM. No dia sete, realizou-se a retirada do pessário vaginal seguido do controle de estro por 48 h. Durante esse período, a inseminação artificial foi realizada de maneira tradicional, com intervalos de 12 h após a manifestação de estro. As novilhas que não apresentaram estro no final das 48 h de controle receberam uma dose de 100 μ g de GnRH (IM) e foram inseminadas entre 16 e 24 h após, sem controle de estro (inseminação artificial em tempo fixo - IATF). Os animais do grupo-controle receberam o mesmo



tratamento hormonal, mas sem a aplicação de eCG no dia seis. A Fig. 1 mostra o esquema hormonal empregado em novilhas dos grupos-tratamento (eCG - confirmação).

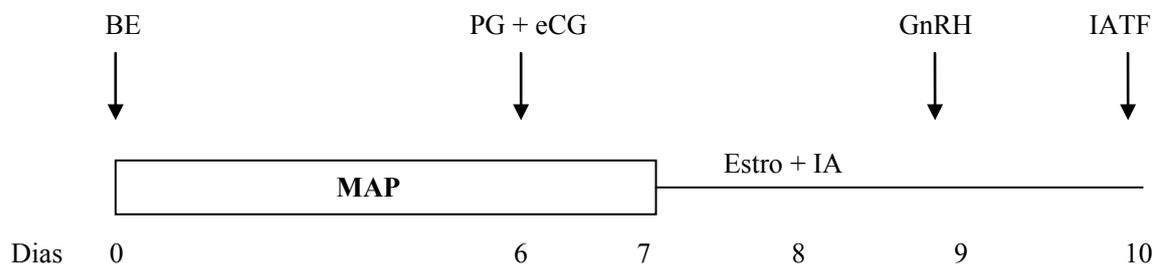


Figura 1. Esquema das aplicações hormonais empregadas nas novilhas entre 12 e 14 meses de idade dos grupos-tratamento (eCG - confirmação). As novilhas do grupo-controle apenas não receberam a aplicação de eCG no dia seis.

As inseminações foram realizadas com sêmen originado de uma mesma partida, tendo os parâmetros motilidade, vigor e concentração, avaliados previamente. Para o diagnóstico de gestação realizado 35 a 40 dias após as inseminações, utilizaram-se os recursos de um aparelho ultrassonográfico (Pie Medical). Para a análise estatística, os índices de concepção e prenhez, expressos em percentuais, foram analisados pelo teste de ANOVA em um modelo estatístico para dados categóricos, utilizando-se o Proc Catmod (Categorical Data Analysis Procedures) no programa estatístico SAS.

Resultados e Discussão

As porcentagens de concepção nos grupos-tratamento foram de 50% (12/24, durante o primeiro experimento e de 60,4% 29/48, na confirmação, $P = 0,4013$). Ao agruparem os resultados, os índices de concepção foram significativamente superiores, ao utilizarem eCG, em relação ao grupo-controle ($P = 0,0341$; Tab. 1). De maneira similar, os índices de prenhez nos grupos-tratamento foram de 46,9% (15/32, no primeiro experimento) e de 45,6% (42/92, na confirmação, $P = 0,9048$). Os resultados agrupados de prenhez dos grupos-tratamento foram significativamente superiores ($P = 0,0358$) ao grupo-controle (Tab. 1).

O maior índice de concepção nas novilhas que receberam eCG pode ser devido ao incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona, conforme descrito por Marques et al. (2003), aliado ao aumento dos índices de ovulação, principalmente naqueles animais que ainda não estão ciclando ou se encontram em anestro e foram tratados com essa gonadotrofina.

Um ponto importante, nesse sentido, diz respeito ao diâmetro máximo do folículo dominante quando do emprego do GnRH na indução da ovulação. A produção de um embrião viável requer a ovulação de um oócito competente, uma adequada produção de progesterona pelo corpo lúteo e um adequado ambiente uterino (Perry et al., 2005). A possibilidade de promover um maior crescimento folicular após o emprego do eCG, como nos grupos-tratamento, permite a obtenção de um folículo com diâmetro compatível com uma melhor resposta à onda pré-ovulatória do LH, induzida pelo GnRH. Ainda, esse maior folículo pré-ovulatório resultará em um corpo lúteo com maior tamanho e capacidade de produzir maiores concentrações de progesterona.

MacNatty et al. (1979) sugeriram que o desenvolvimento de um corpo lúteo fisiológico depende de o folículo pré-ovulatório apresentar um adequado número de células da granulosa, um adequado número de receptores para o LH nas células da teca e granulosa, com capacidade de sintetizar quantidades suficientes de progesterona após luteinização. Um maior crescimento folicular, o desejado após o emprego do eCG, permitirá alcançar essas características, e a ovulação de um folículo de maior diâmetro reverterá em um corpo lúteo maior. Também, o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro do ciclo subsequente à IATF pode melhorar o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação (Baruselli et al., 2004) por permitir maior produção de interferon τ (INF- τ) e a inibição de liberação de prostaglandina ao redor do dia 16 após a inseminação (Mann e Lamming, 2001).

Tabela 1. Índices de concepção e prenhez de novilhas de 12 a 14 meses de idade submetidas à indução de estro e à ovulação com e sem eCG.

Grupos	Vacas (n)	Concepção (%)	Prenhez (%)	
			IATF	Total
eCG	32	50,00 (12/24) ^a	37,50 (3/8)	46,90 (15/32) ^a
Confirmação	92	60,4 (29/48) ^a	29,50 (13/44)	45,60 (42/92) ^a
s/eCG	32	23,00 (3/13) ^b	26,30 (5/19)	25,00 (8/32) ^b

IATF: inseminação artificial em tempo fixo. Diferença entre grupos ($P < 0,05$).



Por outro lado, o baixo índice de prenhez alcançado pelo grupo-controle (25%) mostra que apenas o tratamento com gestágeno e estradiol não permitiu estimular ou induzir a maioria das fêmeas à ciclicidade estral. Com isto, o estado puberal das novilhas no início do tratamento pode ter afetado os índices de prenhez referidos. Byerley et al. (1987) relatam que baixos índices de prenhez e concepção são esperados quando novilhas são cobertas no seu primeiro estro.

Resultados experimentais obtidos por Sirois e Fortune (1988) revelaram, ainda, que o crescimento folicular em novilhas é dado em forma de ondas foliculares, e o modelo comum de desenvolvimento é o de três ondas de crescimento folicular. Em animais no início da puberdade, entretanto, várias ondas se sucedem antes da primeira ovulação, os folículos crescem e regridem continuamente, até que níveis de estradiol produzidos por eles sejam suficientes para desencadear a onda pré-ovulatória de LH. Nesses períodos de crescimento, os folículos crescem e regridem sem alcançar o diâmetro compatível com o evento da ovulação. O emprego do eCG junto ao gestágeno, nos dois grupos-tratamento possibilitou às fêmeas tratadas o pronto estabelecimento do ciclo, um maior crescimento folicular e uma melhor sincronização do estro.

Por outro lado, os índices de prenhez obtidos na IATF ficaram aquém do esperado, variando de 37,5% (3/8) e 29,5% (13/44), nos grupos-tratamento, e 26,3% (8/32), no grupo-controle. Talvez, algumas novilhas falharam em ovular devido ao fato de o folículo não ter alcançado um diâmetro compatível com o GnRH na indução da ovulação. Sartori et al. (2001) mostraram que folículos, ao redor de 10 mm de diâmetro, adquirem capacidade ovulatória. No entanto, necessitam de uma dose maior de LH para ovular quando comparados a folículos com mais de 12 mm. Além disso, a competência de desenvolvimento do oócito é adquirida gradualmente e aumenta com o desenvolvimento folicular (Machatkova et al., 2004), como também a fertilidade do oócito ovulado pode ser menor do que os provenientes de uma ovulação natural (Byerley et al., 1987). Desta maneira, a maturação alterada oocitária compromete a fertilização (Wehrman et al., 1993). Acredita-se, assim, que esses resultados sejam a explicação para os índices de prenhez alcançados na IATF, aliados à ocorrência de perdas embrionárias ou mortalidade fetal por inadequado desenvolvimento do oócito resultante de uma ovulação induzida de folículos menores do que 10 mm.

Os resultados do presente estudo, no entanto, mostraram que a sincronização e ou indução de estros em novilhas de 12 a 14 meses de idade é uma ferramenta de manejo interessante para o desempenho reprodutivo dessas fêmeas. A precoce manifestação de estros em fêmeas tratadas com eCG, após a retirada do MAP (41,0%), mesmo não apresentando diferença significativa entre os grupos avaliados, possibilitou que um número expressivo delas manifestasse estro e tivesse a possibilidade de conceber no início da estação de monta. Como consequência, as novilhas irão parir no início da estação de produção. Esse fato é importante em novilhas de primeira cria, que necessitam de um maior tempo pós-parto para se recuperar do parto e, ainda, continuar o seu desenvolvimento corporal. Aliado a isso, a associação do MAP ao eCG baseada nos resultados obtidos nas duas etapas do estudo experimental permitiram alcançar níveis de prenhez ao redor de 50% em três dias de inseminação artificial.

Conclusão

A associação de eCG à suplementação com acetato de medroxiprogesterona possibilita incremento nos índices de prenhez em novilhas de 12 a 14 meses de idade.

Referências

- Anderson LH, McDowell CM, Day ML.** Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biol Reprod*, v.54, p.1025-1031, 1996.
- Baruselli PS, Bó GA, Reis EL, Marques MO.** Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 1, 2004, Londrina, PR. Anais... Londrina: [s.n.], 2004. p.155-165.
- Bastos GM, Brenner RH, Willke FW, Neves JP, de Oliveira JF, Bragança JF, Machado SA, Porciúncula PM, Gonçalves PB.** Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology*, v.62, p.847-853, 2004.
- Bó GA, Baruselli PF, Martinez, MF.** Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.307-326, 2003.
- Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE.** Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J Anim Sci*, v.65, p.645-650, 1987.
- Bridges PJ, Lewis PE, Wagner WR, Inskoop EK.** Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v.52, p.573-583, 1999.
- Fike KE, Day ML, Inskoop EK, Kinder JE, Lewis PE, Short RE, Hafs HD.** Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or



- without a subseqüente injection of estradiol benzoate. *J Anim Sci*, v.75, p.2009-2015, 1997.
- Gonzalez-Padilla E, Niswender GD, Wiltbank JN.** Puberty in beef heifers. II. Effects of injections of progesterone and estradiol-17 β on serum LH, FSH and ovarian activity. *J Anim Sci*, v.40, p.1105-1109, 1975.
- Gottschall CS.** Desempenho reprodutivo de novilhas submetidas a um programa de sincronização deaios e avaliação do trato reprodutivo. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.21-33, 1999.
- Lammoglia MA, Short RE, Bellows SE, Bellows RA, MacNeil MD, Hafs HD.** Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone releasing insert and prostaglandin F2 α . *J Anim Sci*, v.76, p.1662-1670, 1998.
- Maciel MN, J.P. Neves, P.B.D. Gonçalves, J.F.Oliveira, E.B. Bortolotto, P. Stranieri.** Programa hormonal associado ao desmame temporário, na indução de ovulação em vacas de corte durante o pós-parto. *Ciênc Rural*, v.31, p.473-478, 2001.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M.** Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329-335, 2004.
- MacNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ.** The microenvironment of the human antral follicle: interrelationship among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, v.49, p.851-860, 1979.
- Mann GE, Lamming GE.** Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, v.121, p.175-180, 2001.
- Marques MO, Reis, EL, Campos Filho, EP, Baruselli, PS.** Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: Simpósio Internacional de Reproducción Animal, 5, 2003, Huerta Grande, 2003. Cordoba, Argentina: IRAC, 2003. v.1, p. 392. Resumo.
- Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR.** Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fertil*, v.70, p.243-253, 1984.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW.** Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.102, p.5268-5273, 2005.
- Rasby RJ, Day ML, Johnson SK, Kinder JE, Lynch JM, Short RE, Wettemann RP, Hafs HD.** Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subseqüente injection of estradiol. *Theriogenology*, v.50, p.55-63, 1998.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC.** Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- Schillo KK, Hall JB, Hileman SM.** Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci*, v.70, p.3994-4005, 1992.
- Short RE, Bellows RA, Carr JB, Staigmiller RB, Randel RD.** Induced or synchronized puberty in heifers. *J Anim Sci*, v.43, p.1254-1258, 1976
- Sirois J, Fortune E.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by Real - Time ultrasonography. *Biol Reprod*, v.39, p.308-317, 1988.
- Smith VG, Chenault JR, McAllister JF, Lauderdale JW.** Response of postpartum beef cows to exogenous progestagens and gonadotropin releasing hormone. *J Anim Sci*, v.64, p.540-551, 1987.
- Vogg G, Souza, CJM, Jaume, CM, Moraes, JCF.** Utilidade do benzoato de estradiol após a suplementação com gestágeno na sincronização deaios de novilhas de corte. *Acta Sci Vet*, v.32, p.41-46, 2004.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE.** Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. *Biol Reprod*, v.49, p.214-220, 1993.
-