

AUGUSTO RODRIGUES FELISBINO NETO

**Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em novilhas Nelore  
(*Bos Indicus*)**

São Paulo

2021

AUGUSTO RODRIGUES FELISBINO NETO

**Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em novilhas Nelore  
(*Bos indicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Departamento de Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Fisiologia e Manejo da Reprodução

**Orientador:**

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4091 FMVZ	Felisbino Neto, Augusto Rodrigues Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em novilhas Nelore ( <i>Bos indicus</i> ) / Augusto Rodrigues Felisbino Neto. – 2021. 107 f. : il.  Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.  Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.  1. Novilha Nelore. 2. Indução de ciclicidade. I. Título.
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Progesterona Injetável pode ser utilizada para indução de ciclicidade em novilhas da raça Nelore (Bos indicus).", protocolada sob o CEUA nº 2492220119 (ID 006871), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/08/2019.

We certify that the proposal "Injectable progesterone can be used to induction of puberty in Nelore Heifers (bos indicus)", utilizing 578 Bovines (578 females), protocol number CEUA 2492220119 (ID 006871), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 01/2020

Área: Reprodução Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 24 a 28 meses

N: 578

Linhagem: Nelore

Peso: 270 a 360 kg

Local do experimento: Fazenda Santa Vera Barra do Garças-MT

São Paulo, 27 de novembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo





## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 17 de junho de 2020  
CEUA N 2492220119

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Pietro Sampaio Baruselli  
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Progesterona Injetável pode ser utilizada para Indução de ciclicidade em novilhas da raça Nelore (Bos indicus).".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 006395)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 22/abril/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 209,1 milhões de cabeças no ano de 2015. Aproximadamente 80% deste rebanho é composto por raças zebuínas (Bos indicus), principalmente da raça Nelore, ocupando uma área de 167 milhões de hectares (ABIEC, 2016), dentro deste rebanho cerca de 20% são novilhas de 12 a 36 meses. O cenário busca eficiência, devido a produção de alimentos. A lucratividade no sistema de cria está intimamente ligada a eficiência reprodutiva. Para ser eficiente é necessário adoção de tecnologias. No contexto pecuário, em infraestruturas, nutrição, pastagens e reprodução. Em reprodução especificamente uma delas é a biotecnologia da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sendo assim com o melhoramento genético no maior número de fêmeas visando aumento da eficiência reprodutiva e consequentemente a produtividade da pecuária brasileira. Para a produção de um bezerro/matriz/ano é importante o não atraso na concepção, para não refletir na produção de bezerras diminuir o sucesso econômico da atividade. Novilhas pré-púberes no início da estação de monta, devido ao atraso na puberdade é um entrave para lucratividade do sistema de produção. Novilhas que parem mais cedo têm maior vida reprodutiva do que as mais tardias, sendo as mais precoces as que apresentam o primeiro parto próximo aos 24/25 meses de idade, ou seja, primeira cobertura/inseminação artificial aos 15 meses, sendo assim alcançam a produtividade máxima (PATTERSON et al., 1992), por produzirem mais bezerras durante sua vida produtiva (MARTIN et al., 1992). Animais de origem Bos taurus apresentam puberdade mais cedo e com uma menor relação de peso corporal adulto quando comparados a novilhas Bos indicus (RODRIGUES, et al, 2002). Geralmente, em novilhas Bos taurus a puberdade ocorre entre 10 e 15 meses com cerca de 270 a 350 Kg (FERRELL, 1982). Animais Bos indicus a puberdade ocorre tardiamente entre 22 e 36 meses, refletindo na idade ao primeiro parto, que está entre 44 - 48 meses de idade (NOGUEIRA, 2004). Novilhas cruzadas apresentam puberdade mais tardiamente que novilhas Bos taurus (PERRY et al., 1991), porém mais cedo que novilhas Bos indicus (RESTLE et al., 1999). O objetivo do estudo será comparar a eficiência do protocolo de indução de ciclicidade utilizando P4 injetável ou um dispositivo intra-vaginal de P4 de 4º uso, na taxa de resposta à indução e taxa de prenhez comparados com animais já ciclando em novilhas Nelore (Bos indicus). Serão verificados as taxas de resposta de indução a ciclicidade e a taxa de prenhez da segunda ovulação avaliada por ultrassonografia 30 dias após a IATF. "

Comentário da CEUA: "Não existem óbices éticos para a aprovação desta emenda. Serão avaliados animais que já seriam protocolados para o procedimento de IATF, com pequenas modificações. Não foi apresentado o novo TCLE assinado. Como os dizeres do TCLE anterior estão adequados e esta Comissão avalia um "modelo" do TCLE consideramos a emenda aprovada, mas ressaltamos que é de responsabilidade do pesquisador manter os documentos assinados pelo período de 5 anos após o término da proposta e que estes devem estar à disposição."

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo





## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Eficiência do protocolo de indução de ciclicidade com manejo único utilizando progesterona injetável de longa ação em Novilhas Nelore (*Bos indicus*).", protocolada sob o CEUA nº 8942160120 (ID 007705), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "Efficiency of protocol of ciclicity induction with handle unique use injectable progesterone long action in Nelore heifers (*Bos indicus*).", utilizing 528 Bovines (528 females), protocol number CEUA 8942160120 (ID 007705), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2020 a 04/2020 Área: Reprodução Animal

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Fêmeas	idade:	14 a 15 meses	N:	528
Espécie:	Bovinos			Peso:	270 a 350 kg		
Linhagem:	Nelore						

Local do experimento: Fazenda Santa Vera - Barra do Garças-MT

São Paulo, 08 de abril de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da dose de gonadotrofina coriônica equina na taxa de prenhez aos 30 e 60 dias em novilhas Nelore (*Bos indicus*).", protocolada sob o CEUA nº 5796310818 (ID 007287), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Effect of the dose of eCG on pregnancy rate 30 and 60 days after TAI of Nelore (*Bos indicus*) heifers.", utilizing 450 Bovines (450 females), protocol number CEUA 5796310818 (ID 007287), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2018 a 11/2020

Área: Reprodução Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 24 a 28 meses

N: 450

Linhagem: NELORE

Peso: 270 a 360 kg

Local do experimento: Fazenda Santa Vera Barra do Garças-MT

São Paulo, 18 de dezembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo





## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em Novilhas Nelore (*Bos indicus*).", protocolada sob o CEUA nº 7206110320 (ID 007976), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/06/2020.

We certify that the proposal "Strategies to optimize the IATF protocol in Nelore Heifers (*Bos indicus*).", utilizing 1500 Bovines (1500 females), protocol number CEUA 7206110320 (ID 007976), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Augusto Rodrigues Felisbino Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/17/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 07/2020 a 10/2020

Área: Reprodução Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 22 a 24 meses

N: 1500

Linhagem: Nelore

Peso: 270 a 350 kg

Local do experimento: Fazenda Santa Vera - Barra do Garças - MT Fazenda Santa Cruz da Serra - Nova Xavantina - MT Fazenda Jacarandá - Araguaiana - MT

São Paulo, 30 de junho de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coodenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo





## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FELISBINO NETO, Augusto Rodrigues

Título: **Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico aos meus pais, João Humberto (in memória) e Gauta, por todo apoio, amor, exemplo e disciplina. Muito obrigado por acreditarem em mim!

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **João Humberto** (in memoria) e **Gauta**, por todo amor, educação, exemplo de pessoas honestas e dedicadas e pela vida.

A minha irmã **Alessandra**, pelo companheirismo, mesmo distante, é sempre presente em nossas vidas.

A minha esposa **Nalba**, pela ótima mãe, dedicada e cuidadora da nossa filha **Maria Luiza**.

Ao meu orientador **Prof. Pietro Sampaio Baruselli**, pela atenção, conselhos, dicas e exemplo de humildade e seriedade em tudo que formos fazer, assim chegaremos longe.

A empresa **Ourofino Saúde Animal**, que me proporcionou o tempo que quando precisei para assistir as aulas e pelos amigos que me deu.

Ao **Karbox (Bruno), Bruna, Michele, Evandro**, pelas orientações, nem que seja tomando uma cerveja de madrugada em um quarto de hotel, né **Karbox**.

Aos proprietários e gerentes das fazendas onde realizamos os experimentos, **Luciano bolzan, Rafael anjos, Jairinho, Luciano, Nilton, Reinaldo, Marcio Oliveira, Rogério Fonseca, Leonardo Serafim, José Carlos E. Jr, Thiago Lima e Rafael Augusto**, que sempre me ajudaram nos experimentos.

Ao **Fernandão**, que sempre me ajudou nos experimentos, na verdade, fez bastantes manejos. Por ceder à fazenda em que trabalha, todo ano para fazermos experimentos.

Aos amigos de Barra do Garças, **Bigode de foca (João Carlos) Gefferson, Rodrigo (Corin), Canela, Peroba**, pela ajuda nos experimentos.

A todos os colegas do VRA, **Badá, Gaúcho, Marcão, Laísa, Flávia, Tuba, Emiliana, Rômulo, Crepaldi, Damiana, Bruna, Laís, Luana**.

Ao **Profº José Nélio**, por ajudar nas estatísticas e orientações de dados relevantes.

À **Harumi**, por sempre ajudar com as documentações do VRA e orientações para conclusões das pendências.

Aos queridos professores do VRA, **Mayra, Marcílio, Cláudia, Guilherme Pugliesi, Ed Hoffman, Camila, Carla e Ricardo**, por todos os ensinamentos.

Gostaria de agradecer às fazendas onde realizamos os experimentos, Banco Safra, Vera Cruz, Santa Ana, Ana Cláudia, Jacarandá, Brasil, Santa Vera e Santa Cruz e os animais o que sempre trabalhamos em harmonia para coletar bastantes informações para a ciência.

Obrigado por tudo e por contribuírem muito com nossas pesquisas. Vocês merecem todo meu respeito e admiração!

*“Quem, se não eu, Quando, se não agora”  
(Coronel Evane-BOPE)*

## RESUMO

FELISBINO NETO, A. R. **Estratégias para otimizar o protocolo de IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*)**. 2021. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os objetivos dos estudos foram: Avaliar protocolos de indução de ciclicidade (IC) previos à IATF (Exp1 e 2); Estudar diferentes doses de eCG na remoção do dispositivo de P4 (Exp3) e avaliar a permanência do dispositivo (PD) de P4 (7 ou 8 dias) no protocolo de sincronização para IATF (Exp4). Todos os experimentos em novilhas Nelore. Exp1, 992 animais com  $24,0 \pm 3,10$  meses de idade foram avaliados quanto à presença de CL e divididos em: Animais S/CL, 1) Disp4<sup>o</sup>uso (n= 281); 2) P4Inj [150mg de P4 injetável, (n=276)], ambos receberam 0,5mg de CE (cipionato de estradiol) 12 dias após e, 3) Animais C/CL (Cicl, n=414, sem tratamento). Em um subgrupo de animais (n=21), amostras de sangue foram colhidas para dosagem de P4. Exp2, 528 animais de 14 meses de idade foram divididos em: Controle (sem tratamento, n=138); Disp4<sup>o</sup>uso (dispositivo de P4 por 12 dias; n=134); P4Inj+CE (n=126) e P4Inj (n=130). O grupo Disp4<sup>o</sup>uso e P4Inj+CE receberam 0,5mg de CE 12 dias após o tratamento com P4. Exp3, 398 animais de  $24,0 \pm 1,12$  meses de idade tratados ou não com [0; 200; 300 (UI)] de eCG na remoção do dispositivo de P4. Exp4, 1.211 animais de 24 meses de idade receberam protocolo com 7 (P47d) ou 8 (P48d) dias de permanência de P4. No Exp1, as concentrações plasmáticas de P4 foram semelhantes nos grupos tratados com P4 até 11 dias após o tratamento ( $>1\text{ng/ml}$ ). E também foram superiores ao Controle ( $0,56 \pm 0,2^b$  ng/mL). A presença de CL no D0 [DispP4=80,8% (227/281); P4Inj=82,6% (228/276); P=0,34] e a taxa de prenhez (TP) à IATF [DispP4=50,53% (141/281); P4Inj=51,45% (142/276); Cicl=51,45% (213/414); P=0,96] foram semelhantes. No Exp2 os grupos tratados para IC aumentaram a presença de CL no D0 (Controle=30,8%<sup>b</sup>; Disp=66,2%<sup>a</sup> vs P4 Inj+CE=57,9%<sup>a</sup>; P4inj=56,9%<sup>a</sup>; P<0,001) e a TP à IATF (Controle=23,9%<sup>b</sup>; Disp=38,8%<sup>a</sup>; P4Inj+CE=29,0%<sup>ab</sup>; P4inj=40,6%<sup>a</sup>; P<0,001). Entretanto, sem diferenças quanto à fonte de P4 e a adição ou não de CE ao final do protocolo de IC. No Exp3, a eCG aumentou as taxas de ovulação (P=0.002) e TP no D40 (P=0.05) e D70 (P=0.02). Não houve efeito de dose de eCG na TP no D40 (P=0.89) e D70 (P=0.98). No Exp4, sem diferenças na TP no D30 entre os grupos [P47d=56,2%

(333/593) VS P48d=51,3% (317/618); P=0,67]. Entretanto, houve interação (P=0,05) PD\*manejo nutricional para a TP à IATF. A TP melhorou no P47d somente nas fazendas que realizavam a suplementação nutricional [P47d=59,2% (261/441); P48d=51,0% (225/441); P=0,01]. Não houve melhora nas fazendas que não realizavam suplementação protéico/energética [P47d=47,4% (72/152); P48d=52,0% (92/177); P=0,41]. Conclui-se que: 1) a P4inj de longa ação induz ciclicidade (Exp1); 2) não é necessária a administração de CE 12 dias após o início do tratamento com P4inj para aumentar a eficiência da IC (Exp2); 3) a dose de eCG na remoção do dispositivo de P4 pode ser reduzida para 200UI, sem comprometer a eficiência do protocolo de IATF (Exp3) e; 4) a redução da PD intravaginal de P4 de 8 para 7 dias em fazendas que realizam suplementação nutricional proteico/energética aumenta a TP à IATF (Exp4).

Palavras-chave: Novilha Nelore. Indução de ciclicidade.

## ABSTRACT

FELISBINO NETO, A. R. **Strategies to optimize the IATF protocol in Nellore heifers (*Bos indicus*)**. 2021. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The objectives of the studies were: Evaluate cyclicity induction (CI) protocols prior to FTAI (Exp1 and 2); Study different eCG doses on removal of the P4 device (Exp3) and assess the permanence of the P4 device (PD) (7 or 8 days) without synchronization protocol for FTAI (Exp4). All experiments in Nellore heifers. Exp1, 992 animals with  $24.0 \pm 3.10$  months of age were adopted for the presence of CL and divided into: Animals S/CL, 1) Disp4<sup>0</sup>use (n=281); 2) P4Inj [150mg of injectable P4, (n = 276)], both received 0.5mg of EC (estradiol cypionate) 12 days after and, 3) C/CL animals (Cicl, n=414, no treatment). In a subgroup of animals (n=21), blood is collected for P4 measurement. Exp2, 528 animals 14 months of age divided into: Control (no treatment, n=138); Disp4<sup>0</sup>use (P4 device for 12 days; n=134); P4Inj + CE (n=126) and P4Inj-CE (n=130). The Disp4<sup>0</sup>use and P4Inj + EC group received 0.5mg of EC 12 days after treatment with P4. Exp3, 398 animals of  $24.0 \pm 1.12$  months of age treated or not with [0; 200; 300 (IU)] of eCG on removal of the P4 device. Exp4, 1,211 animals 24 months of age received a protocol with 7 (P47d) or 8 (P48d) days of P4 permanence. In Exp1, plasma P4 concentrations were similar in P4-treated groups up to 11 days after treatment ( $>1\text{ng/ml}$ ). And they were also superior to the Control ( $0.56 \pm 0.2\text{b ng/mL}$ ). The presence of CL on D0 [Disp P4=80.8% (227/281); P4Inj=82.6% (228/276);  $P=0.34$ ] and the pregnancy rate (TP) at the FTAI [Disp P4=50.53% (141/281); P4Inj=51.45% (142/276); Cycl=51.45% (213/414);  $P=0.96$ ] were similar. In Exp2 the groups treated for HF increased the presence of CL on D0 (Control=30.8%<sup>b</sup>; Disp=66.2%<sup>a</sup> vs P4Inj+CE=57.9%<sup>a</sup>; P4inj-CE=56.9%<sup>a</sup>;  $P<0.001$ ) and PT at FTAI (Control=23.9%<sup>b</sup>; Disp=38.8%<sup>a</sup>; P4Inj+CE=29.0%<sup>ab</sup>; P4inj-CE=40.6%<sup>a</sup>;  $P<0.001$ ). However, there were no differences regarding the source of P4 and the addition or not of CE at the end of the CI protocol. In Exp3, eCG increased ovulation rates ( $P=0.002$ ) and TP in D40 ( $P=0.05$ ) and D70 ( $P=0.02$ ). There was no eCG dose effect on PT at D40 ( $P=0.89$ ) and D70 ( $P=0.98$ ). In Exp4, no differences in PT on D30 between groups [P47d=56.2% (333/593) vs P48d=51.3% (317/618);  $P=0.67$ ]. However, there was interaction ( $P=0.05$ ) PD\*nutritional management for TP to FTAI. The TP improved in P47d only in farms that performed



nutritional supplementation [P47d=59.2% (261/441); P48d=51.0% (225/441); P=0.01]. There was no improvement on farms that did not perform protein/energy supplementation [P47d=47.4% (72/152); P48d=52.0% (92/177); P=0.41]. It is concluded that: 1) the long-acting P4inj induces cyclicity (Exp1); 2) the administration of EC 12 days after the start of treatment with P4inj is not necessary to increase the efficiency of the IC (Exp2); 3) the dose of eCG upon removal of the P4 device can be reduced to 200IU, without compromising the efficiency of the FTAI protocol (Exp3) and; 4) the reduction of intravaginal PD of P4 from 8 to 7 days in farms that perform nutritional protein/energy supplementation increases the TP at FTAI (Exp4).

Keywords: Nelore Heifer. Induction of cyclicity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo conceitual para mudanças endócrinas responsáveis para a ocorrência da puberdade em novilhas..... 33
- Figura 2 - Modelo para o papel da kisspeptina e neurônio kiss1 mediados pelo efeito da leptina sobre a secreção de GnRH. Com nutrição e status metabólicos adequados (figura da esquerda) existe um forte sinal da leptina sobre neurônios Kiss1 e um positivo impacto na função reprodutiva..... 36
- Figura 3 - Modelo para a ação da Grelina e leptina durante energia insuficiente (Grelina) e energia suficiente (leptina) que pode ser usado para conceituar os papéis da Grelina e leptina antes de depois da puberdade. Durante energia suficiente, leptina inicia sinais positivos nos neurônios Kisspetina, enquanto durante energia insuficiente, Grelina inicia sinais negativos nos neurônios Kiss/GnRH..... 38
- Figura 4 - Modelo para inter-relação de leptina, kisspeptina, POMC e NPY durante a transição de pré-púbere para púbere em novilhas. Durante o período púbere leptina inicia aumentando fortemente sinais positivos sobre neurônios Kiss 1 e POMC..... 38

- Figura 5 - Delineamento Experimental com análises variáveis do subgrupo n=21, onde: 1) Grupo Controle: não receberam tratamentos hormonais; 2) Grupo InjD10: receberam 1,0mL (150mg, Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação no D-22; 3) Grupo InjD12: receberam 1,0mL (150mg, Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação no D-24. 4) Grupo DispD12: também no D-24, receberam um dispositivo intravaginal (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias..... 50
- Figura 6 - Delineamento Experimental com os grupos onde, 1) Grupo DispD12: no D-24, receberam um dispositivo intravaginal (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias e no D-12 receberam 0,5mg de CE; 2) Grupo InjD12: receberam 1,0mL (150mg, Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação no D-24 e no D-12 receberam 0,5 mg de CE; 3) Grupo Ciclando: animais já ciclando, não receberam nenhum tratamento prévio a IATF..... 51
- Figura 7 - Delineamento Experimental, com esquemas dos grupos de n=528 animais, onde: Grupo Controle (Sem tratamento Hormonal); Grupo Dispositivo 4º uso com 12 dias de suplementação de P4 por um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias; Grupo P4 Inj + CE [(Sincrogest Injetável®), 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação por 12 dias] e Grupo P4 Inj (Sincrogest Injetável®), 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação, também por 12 dias. Grupo Dispositivo e Grupo P4 inj + CE receberam 0,5mg de ciproionato de estradiol (CE) no D-12, o Grupo controle e Grupo P4 Inj não receberam..... 61

Figura 8 -	Delineamento experimental onde: Grupo 1) os animais receberam 0UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) mg i. m. Grupo 2) os animais receberam 200UI eCG mg i. m. Grupo 3) os animais receberam 300UI de eCG mg i.m.....	70
Figura 9 -	Delineamento experimental onde as análises variáveis serão analisadas em todos os Grupos experimentais citados na figura 8. Desde o protocolo de indução à ciclicidade, passando por avaliações ultrassonográficas com avaliações ovarianas até a o diagnóstico de gestação. US: Avaliações ultrassonográficas DG: Diagnóstico de gestação.....	70
Figura 10 -	Representação esquemática do delineamento experimental realizado, n=1.211 animais, nos grupos com 8 e 7 dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4.....	80

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do tratamento da eCG na remoção do implante sobre a dinâmica folicular, função luteal e prenhez por IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante de norgestomet e benzoato de estradiol..... 42
- Tabela 2 - Relação entre duração de protocolos (7, 8 ou 9 dias de exposição ao implante de P4) e administração de GnRH no momento da IA, na expressão de cio e prenhez por IA..... 45
- Tabela 3 - Efeito da dose de eCG (0, 200 e 300UI) no momento da remoção do dispositivo de P4 (D8) na resposta folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de IATF..... 72
- Tabela 4 - Efeito da dose de eCG (0, 200 e 300UI) no momento da remoção do dispositivo (D8), nas taxas de ovulação, prenhez e perdas gestacionais em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de IATF..... 73
- Tabela 5 - Efeito da presença de CL no D0 sobre o diâmetro do maior folículo no D10, diâmetro do CL no diestro subsequente (D17), taxa de ovulação, taxa de prenhez no D40 e D70 e perdas gestacionais em novilhas Nelore submetidas ao protocolo de IATF..... 76

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico da probabilidade de ovulação em novilhas Nelore tratadas (linha fixa) ou não tratadas (linha pontilhada) com ECG, de acordo com o diâmetro do maior folículo no D8. A administração de eCG aumentou a probabilidade de ovulação no final do protocolo quando somente pequenos ou médios folículos (4-8mm de diâmetro) foram observados nos ovários no momento da remoção do implante (D8) (Adaptado de Sá Filho et al., 2010a)..... 43
- Gráfico 2 - Perfil plasmático de P4 no dia da distribuição dos grupos e início dos tratamentos (D-24), 10 e 12 dias após o início dos tratamentos (D-14 e D-13), no momento do tratamento com 0,5mg de ECP (D-12) e um (D-11) e dois (D-10) dias após o tratamento com ECP. Grupo Dispositivo 4º uso (Disp12; n= 281) que receberam por 12 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias; e Grupo Injetável (Sincrogest Injetável®) que receberam 150mg de P4 injetável de longa ação por 10 (InjD10) ou por 12 dias (InjD12)..... 53
- Gráfico 3 - Taxas (%) de respostas a indução de ciclicidade no D0 do protocolo de IATF no Grupo Dispositivo 4º uso n= 281, onde receberam por 12 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias e Grupo Injetável (Sincrogest Injetável®) onde receberam 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação, também por 12 dias..... 54

Gráfico 4 -	Taxas (%) de prenhez aos 30 dias do após a IATF no Grupo Dispositivo, onde receberam por 12 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias e Grupo Sincrogest Injetável (Sincrogest Injetável®), onde receberam 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação, também por 12 dias.....	54
Gráfico 5 -	Taxa de prenhez (%) à IATF conforme ciclicidade (presença de CL) no D0 (início do protocolo de sincronização para IATF) em novilhas Nelore que receberam tratamento para indução de ciclicidade com dispositivo de P4 ou com P4 injetável de longa ação.....	55
Gráfico 6 -	Taxa de indução de ciclicidade no D0 do protocolo de IATF no Grupo Controle (sem tratamento hormonal), Grupo dispositivo (dispositivo intravaginal de progesterona; Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias, Grupo P4 injetável+CE (onde receberam 1,0ml, 150mg) de P4 injetável de longa ação Injetável (Sincrogest Injetável®), e Grupo P4 inj (onde receberam 1,0ml, 150mg) de P4 injetável de longa ação Injetável (Sincrogest Injetável®).....	62
Gráfico 7 -	Taxas (%) de respostas a indução de ciclicidade no D0 do protocolo de IATF de acordo com o peso (kg) no D-24.....	63
Gráfico 8 -	Taxas (%) de prenhez na IATF de acordo com os grupos experimentais.....	63

Gráfico 9 - Taxa (%) de prenhez entre os grupos 7 vs 8 dias de dispositivo.....	82
Gráfico 10 - Taxa de prenhez entre os grupos com 7 vs 8 dias, estratificados entre as fazendas que utilizam ou não suplementação nutricional.....	82



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>32</b>
	2.1 <i>PUBERDADE EM NOVILHAS</i> .....	32
	2.2 <i>EFEITOS DA NUTRIÇÃO, HORMÔNIOS METABÓLICOS E ESTERÓIDES NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS</i> .....	34
	2.2.1 <i>Hormônios metabólicos e Nutrição</i> .....	34
	2.2.2 <i>Hormônios esteroides e a relação com a puberdade em Novilhas</i> .....	40
	2.3 <i>RELAÇÕES ENTRE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) E DESEMPENHO NA IATF DE NOVILHAS</i> .....	41
	2.4 <i>RELAÇÕES ENTRE DIAS DE DURAÇÃO DE IMPLANTE DE PROGESTERONA E PREENHEZ</i> .....	44
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTO 1 – PROGESTERONA INJETÁVEL PODE SER UTILIZADA PARA A INDUÇÃO DE CICLICIDADE EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE (BOS INDICUS)</b> .....	<b>48</b>
	3.1 <i>OBJETIVO</i> .....	48
	3.2 <i>HIPÓTESE</i> .....	48
	3.3 <i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	48
	3.3.1 <i>Local e período de execução</i> .....	48
	3.3.2 <i>Animais e instalações</i> .....	49
	3.3.3 <i>Delineamento experimental</i> .....	49
	3.3.4 <i>Avaliações ultrassonográficas</i> .....	51
	3.4 <i>COLHEITAS DE SANGUE</i> .....	51
	3.5 <i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i> .....	52
	3.6 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	53

<b>4 EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE CICLICIDADE COM MANEJO ÚNICO UTILIZANDO PROGESTERONA INJETÁVEL DE LONGA AÇÃO EM NOVILHAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>).....</b>	<b>59</b>
4.1 OBJETIVO.....	59
4.2 HIPÓTESE.....	59
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	59
4.3.1 Local e período de execução .....	59
4.3.2 Animais e instalações.....	59
4.3.3 Delineamento experimental.....	60
4.3.4 Avaliações ultrassonográficas .....	61
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
<b>5 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA DOSE DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA NA TAXA DE PREENHEZ AOS 30 E 60 DIAS EM NOVILHAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>) .....</b>	<b>68</b>
5.1 OBJETIVO.....	68
5.2 HIPÓTESE.....	68
5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
5.3.1 Local e período de execução .....	68
5.3.2 Animais e instalações.....	69
5.3.3 Delineamento experimental.....	69
5.3.4 Avaliações ultrassonográficas .....	70
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	70
5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
<b>6 EXPERIMENTO 4 – ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O PROTOCOLO DE IATF EM NOVILHAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>).....</b>	<b>78</b>
6.1 OBJETIVO.....	78
6.2 HIPÓTESE.....	78
6.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	78

6.3.1 Local e período de execução .....	78
6.3.2 Animais e instalações.....	79
6.3.3 Delineamento experimental.....	79
6.3.4 Avaliações ultrassonográficas .....	80
6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	80
6.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 221,81 milhões de cabeças. Aproximadamente 80% deste rebanho é composto por zebuínos (*Bos indicus*), principalmente da raça Nelore. O rebanho bovino brasileiro ocupa uma área de 164,96 milhões de hectares (ABIEC, 2018) e dentro deste rebanho cerca de 20% são dos animais são da categoria novilhas de 12 a 36 meses. A pecuária brasileira busca o aumento da eficiência para produção de alimentos em quantidade e com qualidade. A lucratividade no sistema de cria está intimamente ligada a eficiência reprodutiva. Entretanto, para que a pecuária seja eficiente é necessário adoção de tecnologias. Na área de reprodução, a biotecnologia da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem colaborado significativamente para o melhoramento genético e da eficiência reprodutiva dos rebanhos, com consequente aumento da produtividade da pecuária brasileira (Baruselli et al., 2017a).

A IATF pode ser utilizada em fêmeas zebuínas pré-púberes de 24 meses (SÁ FILHO et al., 2010c), o que reduz a idade ao primeiro serviço e, conseqüentemente, a idade ao primeiro parto (DAY; NOGUEIRA, 2013). A idade à puberdade e a idade ao primeiro parto afeta diretamente a vida produtiva da vaca (LESMEISTER; BURFENING; BLACKWELL, 1973). Desta forma, quando a primeira parição ocorre aos quatro anos de idade, o índice de desfrute do rebanho fica em torno de 10%. Esse índice aumenta efetivamente com a antecipação da idade à primeira parição. Antecipando o primeiro parto para 24 meses de idade, ou seja, acasalando novilhas aos 15 meses de idade, os índices de desfrute do rebanho atingem 40%, alcançando elevada produtividade (PATTERSON et al., 1992; FRIES; ALBUQUERQUE, 1999).

De acordo com Baruselli et al. (2017b), estudos foram conduzidos para avaliar três sistemas de produção. Avaliou-se a eficiência de novilhas de reposição em uma propriedade de cria com 1000 matrizes em reprodução com 70% de taxa de desmane. No primeiro sistema as novilhas ficam gestantes aos 36 meses, no segundo aos 24 meses e no terceiro, utilizando o modelo precoce, aos 14 meses de idade. Verifica-se que com a antecipação da idade à priméria concepção e ao primeiro parto ocorre a eliminação de categorias na

fazenda, resultando na redução de até 26% na área necessária para manter os animais na propriedade. Nota-se, também, aumento na taxa de desfrute de 25,4% (sistema reprodutivo que emprenha as novilhas aos 36 meses de idade) para 34,1% (sistema reprodutivo que emprenha novilhas precoces aos 14 meses de idade). Este aumento da eficiência é explicado principalmente pela retirada de categorias animal da fazenda (novilhas de 24 a 36 meses e de 36 a 48 meses). Com a utilização dessa tecnologia é possível aumentar a quantidade de vacas na propriedade, resultando em maior produção de kg/bezerros/há no sistema de cria brasileiro. Novilhas de origem *Bos taurus* apresentam puberdade precocemente e com uma menor relação de peso corporal adulto quando comparados a novilhas de origem *Bos indicus* (RODRIGUES et al., 2002). Geralmente, em novilhas *Bos taurus* a puberdade ocorre entre 10 e 15 meses com cerca de 270 a 350 Kg (FERRELL, 1982). Animais *Bos indicus* a puberdade ocorre tardiamente entre 22 e 36 meses, refletindo na idade ao primeiro parto, que está entre 44 - 48 meses de idade (NOGUEIRA, 2004). Novilhas cruzadas apresentam puberdade mais tardiamente que novilhas *Bos taurus* (PERRY et al., 1991), porém mais cedo que novilhas *Bos indicus* (RESTLE et al., 1999).

No entanto, embora os programas de sincronização da ovulação utilizados atualmente apresentem resultados satisfatórios em animais zebuínos, tais protocolos hormonais desenvolvidos e utilizados em vacas lactantes podem não apresentam resultados satisfatórios quando utilizados em novilhas (MENEGETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Diante disso, a idade à puberdade e o momento em que ocorre esse evento fisiológico pode determinar o momento da concepção durante a primeira estação reprodutiva, com impactos na produtividade da fêmea durante sua vida reprodutiva e, conseqüentemente, a eficiência econômica do sistema de criação. Entretanto, para animais que ainda não atingiram a puberdade espontaneamente no início da estação reprodutiva, existe a possibilidade de protocolos para de indução da puberdade (DAY; NOGUEIRA, 2013).

Para a ocorrência da puberdade é necessária uma gradativa diminuição da sensibilidade hipotalâmica ao estradiol, conseqüentemente elevando a liberação de LH, que estimula o crescimento folicular e a produção de estrógeno (NAKADA et al., 2000). O aumento na produção de estrógeno causa

retroalimentação positiva no hipotálamo, liberando pico de GnRH, estimulando à hipófise a liberação do pico pré-ovulatório de LH, que culmina com a ovulação do folículo dominante e formação do corpo lúteo (EVANS et al., 1994). Diversos fatores podem estimular o início da puberdade, entre eles a nutrição, a bioestimulação, a genética e a idade. Entretanto, existe a possibilidade de indução da puberdade por protocolos hormonais a base de progestágenos ou progesterona sintética, que reduz a quantidade de receptores de estradiol no hipotálamo, o que por sua vez reduz a retroalimentação negativa do estradiol na liberação de GnRH. Esses tratamentos resultam no aumento na liberação de LH, um dos mecanismos responsáveis pela indução de puberdade (DAY et al., 1998).

A resposta à sincronização, o tamanho do folículo dominante (FD) ao final do protocolo e a taxa de ovulação são determinantes para o sucesso dos programas de IATF em novilhas. Os folículos de novilhas *Bos indicus* de 24 meses devem atingir um diâmetro mínimo de 7,0 mm para alcançar capacidade ovulatória (GIMENES et al., 2008). Entretanto, folículos de maiores diâmetros resultam em maiores taxas de ovulação, com formação de corpos lúteos de maior tamanho associados a maiores concentrações circulantes de progesterona e, conseqüentemente, maior sucesso na IATF (SÁ FILHO et al., 2010b, 2011) e menor perda gestacional (MANN; PAYNE; LAMMING, 2001).

A administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) pode incrementar a eficiência dos protocolos de IATF em novilhas zebuínas. O uso da eCG aumenta a taxa de ovulação e a concentração circulante de progesterona no ciclo estral subsequente a sincronização (BARUSELLI et al., 2004a), além de aumentar a taxa de prenhez à IATF (DIAS et al., 2009) nessa categoria. Os efeitos positivos do tratamento com eCG estão relacionados com mudanças na taxa de crescimento do folículo dominante e com aumento no diâmetro do folículo ovulatório e do CL formado (MENEGETTI et al., 2009). Estudos evidenciaram correlações positivas entre a concentração plasmática de progesterona e taxa de prenhez (BINELLI et al., 2001), sendo o tratamento com eCG uma ferramenta importante para melhorar a concentração plasmática de progesterona no ciclo estral subsequente à IATF (BARUSELLI et al., 2000), devido principalmente a sua ação luteotrófica (RIGOGGIO et al., 2013).

Os protocolos de sincronização da ovulação para IATF mais frequentemente utilizados em *Bos indicus* apresentam duração da permanência do dispositivo de progesterona por 8 (SÁ FILHO et al., 2010) ou por 9 dias (MENEGETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Entretanto, protocolos de 7 dias têm sido estudados como uma alternativa para a sincronização da ovulação (SANTOS et al., 2018; FERRAZ JR et al., 2016; MADUREIRA et al., 2020). Prata et al. (2020) compararam protocolos de IATF a base de E2/P4 com 7, 8 ou 9 dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4. Os resultados evidenciaram fertilidade similar entre esses protocolos independentemente da duração do período de exposição de P4. Esses dados suportam a flexibilidade dos cronogramas de IATF para a gestão reprodutiva operacional em rebanhos *Bos indicus* de corte.

Dados de estudos realizados por Barbuio et al. (2020) com novilhas Nelore submetidas a protocolos com diferentes durações (7 x 8 dias permanência do dispositivo de P4) evidenciaram aumento na expressão de estro no grupo com 8 dias [54.5% (220/404) vs. 48.4% (182/376)], mas a taxa de prenhez não diferiu entre os grupos [8 dias = 44.3% (179/404) vs. 7 dias = 47.3% (179/376)]. Entretanto, a taxa de ovulação antecipada (entre a remoção do dispositivo de P4 e a IATF) foi maior no grupo com 8 dias do que no grupo com 7 dias [16.7% (13/78) versus 4.7% (4/85)]. Felisbino neto et al. (2019), checaram a taxa de ovulação antecipada (animais que ovulam entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a IATF), em 301 novilhas Nelore, evidenciando 30,3% de taxa de ovulação antecipada. Esses autores não encontraram interação entre a taxa de ciclicidade no D0 e a taxa de ovulação na taxa de prenhez à IATF. As novilhas que apresentaram ovulação antecipada possuíam maior diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8;  $11,1 \pm 1,55^a$  vs.  $9,6 \pm 2,22^b$  mm), entretanto, menor taxa de prenhez à IATF (22,9%; 19/83<sup>b</sup> e 42,9%; 82/191<sup>a</sup>) quando comparadas com novilhas que não apresentaram ovulação antecipada. Esses dados suportam estudos com protocolos com duração de 7 dias para reduzir a taxa de ovulação antecipada, e com isso, melhorar os resultados de fertilidade.

Com o objetivo de compreender melhor a resposta das novilhas Nelore aos protocolos de sincronização da ovulação para IATF, este estudo busca

avaliar diferentes estratégias para otimizar a eficiência dos procedimentos que visam incrementar a performance reprodutiva dessa categoria.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

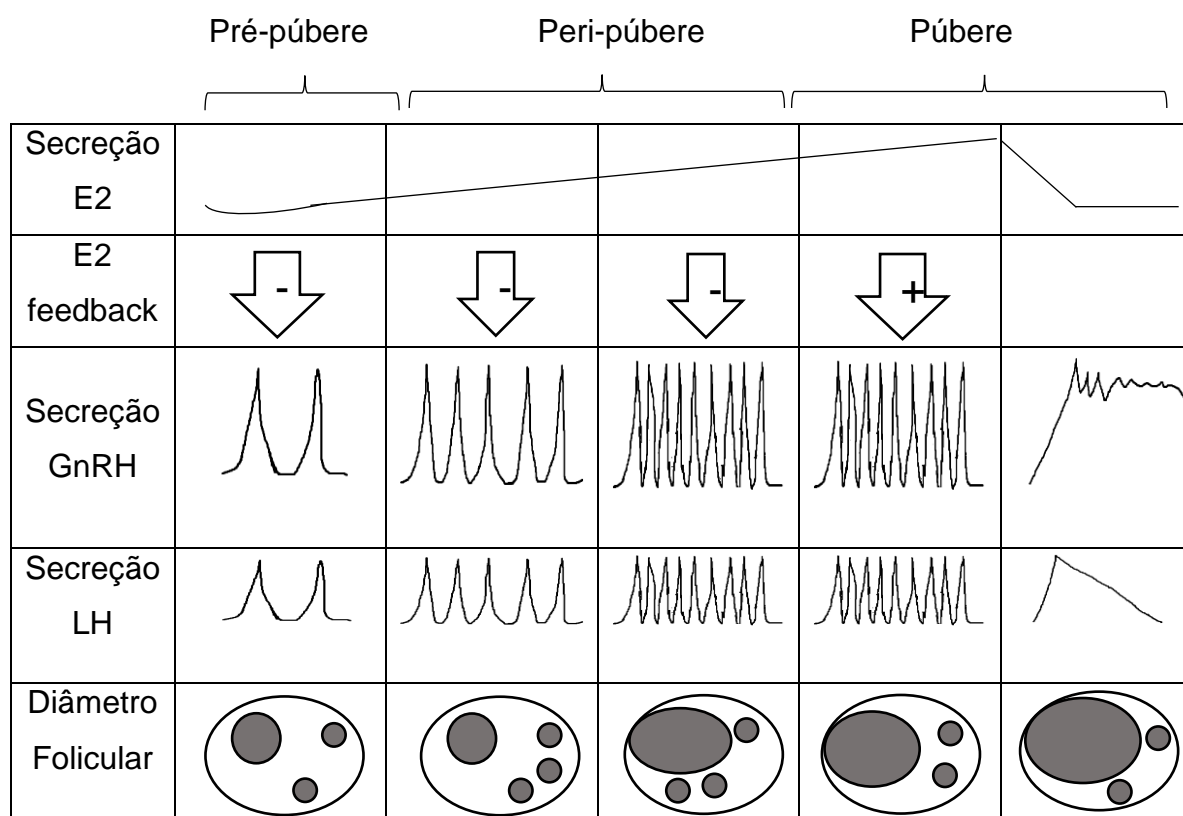
### 2.1 PUBERDADE EM NOVILHAS

Fisiologicamente, a puberdade em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* caracteriza-se por um aumento na concentração e freqüência pulsátil de LH e um decréscimo na sensibilidade do hipotálamo aos esteróides gonadais, com participação ou não de neurotransmissores com capacidade de estimular ou inibir a secreção de LH, hormônio responsável pelo crescimento folicular e indução da primeira ovulação. Os eventos fisiológicos relacionados à primeira ovulação são similares, tanto nas novilhas *Bos taurus*, quanto nas novilhas *Bos indicus*, ocorrendo mais tardiamente em zebuínos (CARDOSO E NOGUEIRA, 2007).

Em bovinos, a pequena quantidade de estradiol (E2) secretada pelos folículos ovarianos após o nascimento é responsável pela supressão na secreção pulsátil de LH. De acordo com Day et al. (1984), a ovariectomia de novilhas pré-púberes aumenta a freqüência e a amplitude dos picos de secreção de LH. Quando fêmeas ovariectomizadas receberam uma administração parenteral de E2, a freqüência pulsátil de LH foi suprimida.

O início do aumento na secreção de gonadotrofinas reflete no grau de maturidade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (EVANS et al.; 1992; KINDER et al., 1995; HONARAMOOZ, 1999). O LH tem a freqüência de picos secretórios aumentados no período (40 a 80 dias) que antecede a primeira ovulação (MELVIN, 1999), seguido por um aumento transitório da secreção de LH e FSH entre sexta e vigésima quarta semanas de idade em novilhas *Bos taurus* (SCHAMS et al., 1981). A concentração sérica de FSH permanece relativamente estável no período que antecede a ovulação (EVANS et al., 1994). No período peri-púbere (30 a 80 dias antes da primeira ovulação), o aumento da freqüência dos picos de secreção de LH resulta no crescimento dos folículos antrais e aumento da produção de estradiol. Em novilhas, a concentração plasmática de E2 permanece baixa até um mês antes da puberdade, quando aumenta gradualmente até o momento da primeira ovulação (NAKADA et al., 2000).

Figura 1. Modelo conceitual para mudanças endócrinas responsáveis para a ocorrência da puberdade em novilhas. Adaptado de Day e Anderson (1998).



Todo esse processo citado acima, comumente chamado de hipótese “gonadostática”, e proposta por Hohlweg e Dohrn *apud* Ojeda e Urbanski (1994), descreve a dessensibilização aos esteróides gonadais, com diminuição do número de receptores hipotalâmicos durante o período de maturação sexual, permitindo aumento da secreção de gonadotrofinas.

Outra hipótese para o início da primeira ovulação, conhecida como “central”, envolve a presença de neurônios com capacidade de estimular ou inibir a secreção de gonadotrofinas, independentemente da ação dos esteróides gonadais. Esse conceito de que determinada área do sistema nervoso central (SNC) controla o desenvolvimento sexual, originou a partir do trabalho descrito por Donavan e Van Der Werff *apud* Ojeda e Urbanski (1994). Estes autores demonstraram que lesões no hipotálamo de ratas resultaram em puberdade precoce. Entre esses, podemos destacar os neurotransmissores capazes de estimular, como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato),

neuropeptídeo Y, noraepinefrina, noradrenalina e ácido aspártico e de inibir, como o GABA, dopamina, opióides endógenos e endorfinas (CARDOSO E NOGUEIRA, 2007). Como exemplo estimulatório, o glutamato (aminoácido) é um importante neurotransmissor que age no SNC e desempenha uma importante função na secreção de substâncias gonadotróficas (BRANN; MAHESH, 1995). Já estímulos inibitórios *in vivo* consideraram que o GABA desempenha importante função na secreção de gonadotrofinas. A infusão do GABA em regiões hipotalâmicas contendo neurônios de GnRH inibe a pulsatilidade de LH em ratas ovariectomizadas (CARBONE et al., 2002). De acordo com Nogueira e Oliveira (2004), a inibição central exercida pelo GABA pode estar presente em novilhas da raça Nelore durante o período de maturação sexual.

Em novilhas, segundo Honaramooz et al. (2000), o aumento da secreção de LH está relacionado à diminuição da retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de GnRH, associado ao aumento da atividade de neurotransmissores estimuladores, com capacidade de estimular ou inibir a secreção de LH. Aparentemente, nos bovinos, o mecanismo responsável pela contenção gonadal envolve inibição hipotalâmica, exercida pelos esteróides gonadais e inibição ou excitação central exercida por aminoácidos, peptídeos, monoaminas e gases difusíveis, conhecido como mecanismo de ação central (HORVATH et al., 2001).

## 2.2 EFEITOS DA NUTRIÇÃO, HORMÔNIOS METABÓLICOS E ESTERÓIDES NO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS.

### 2.2.1 Hormônios metabólicos e Nutrição

A utilização de novilhas jovens nos programas reprodutivos é fundamental para diminuir o intervalo de gerações e acelerar o ganho dos programas melhoramento genético nos sistemas de produção de gado de corte. A adequada gestão da nutrição é crítica para a idade à puberdade e para o desempenho reprodutivo ao longo da vida da fêmea bovina (PATTERSON et al., 1992; WATHES et al., 2014). A deficiência nutricional em novilhas de corte suprime, no hipotálamo, a geração de picos de secreção de

LH (SCHILLO et al., 1983; RAWLINGS et al., 2003), atrasando a primeira ovulação. Novilhas zebuínas criadas em regiões tropicais e corretamente manejadas sob o ponto de vista nutricional tornam-se púberes aos 12,3 meses e parem aos 27 meses de idade (FAJERSSON et al., 1991).

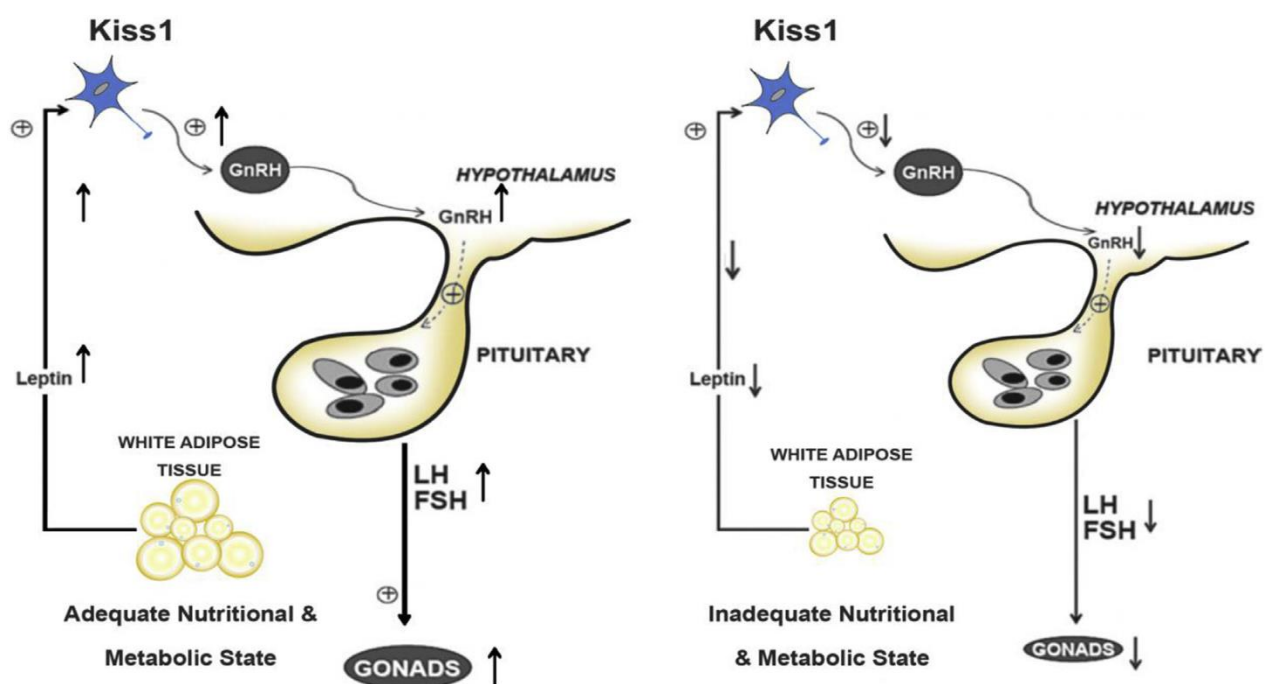
Diferentes fatores parecem estar envolvidos no mecanismo pelo qual a nutrição afeta a liberação de GnRH e, conseqüentemente, o início da puberdade. Dentre eles, podemos citar a leptina, IGF-1, GABA, glutamato, neuropeptídeo Y, ativina, inibina (CARDOSO et al., 2007), e mais recentemente, um novo peptídeo e seus receptores foram identificados como possíveis reguladores chave na ativação dos neurônios GnRH (kisspeptina, receptor GPR54; MAQUIVAR et al., 2011). Além disso, é sabido que neurônios liberadores de GnRH não expressam receptores para estradiol e, portanto, existe a hipótese da existência de uma rede de comunicação entre os neurônios do hipotálamo e a ação de diferentes hormônios citados acima, modulando essa resposta (MAQUIVAR et al., 2011).

Discutivelmente o mais importante papel da leptina em bovinos de corte é controlar o início da puberdade (WYLIE et al., 2011). A leptina age através do receptor GPR54, que está presente nos neurônios de kisspeptina (KISS1) no hipotálamo (TENA-SEMPERE et al., 2006). A kisspeptina se liga aos neurônios de GnRH (Fig. 2) e estimula a sua liberação (ROSEWEIR et al., 2009). Quando as novilhas pré-púberes crescem, elas depositam adipócitos que levam ao aumento das concentrações de leptina na corrente sanguínea. A leptina, quando alcança um limiar, estimula a liberação de kisspeptina que age na maturação púberal dos neurônios de GnRH. A relação entre os neurônios e a associação leptina-kisspeptina-GnRH fornece a explicação endócrina para a hipótese que relaciona o peso corporal e o escore de condição corporal (ECC) com a puberdade em fêmeas (KEISLER et al., 1999). Em um recente relato, a leptina mostrou regular os receptores de GnRH nas células gonadróficas na hipófise anterior (ODLE et al., 2018), sugerindo que a leptina pode agir tanto no hipotálamo quanto na hipófise.

Outros hormônios metabólicos, como a grelina (secretada pelo trato gastro-intestinal) têm sido relacionados como um sinal metabólico de ingestão de alimentos e balanço energético (FERRINI et al., 2009; DELPORTE et al., 2013). Concentrações de grelina na corrente sanguínea de bovinos estão

elevadas durante restrição de ingestão de alimentos e durante o balanço energético negativo (WERTZ-LUTZ et al., 2006; BRADFORD et al., 2008). Receptores de grelina estão presentes no hipotálamo e têm sido proposto que a grelina também regulam os neurônios GnRH. A insulina e a glicose são outros marcadores metabólicos influenciados pela nutrição que impactam a reprodução de fêmeas bovinas de corte (LASKOWSKI et al., 2016; GRIMARD et al., 1995). Novilhas Brahman mantidas em pastos subtropicais melhorados têm concentrações de insulina e glicose aumentadas quando comparadas com novilhas mantidas em pastos normais (SAMADI et al., 2014), relacionando a nutrição com os marcadores metabólicos e endócrinos.

Figura 2. Modelo que apresenta o papel da kisspeptina e do neurônio kiss1 mediados pelo efeito da leptina sobre a secreção de GnRH. Com a nutrição e o status metabólico adequado (figura da esquerda) existe um forte sinal da leptina sobre neurônios Kiss1, com positivo impacto na função reprodutiva (Adaptado de Tena-Sempere et al., 2006 e de D'Occhio et al., 2019).



O mecanismo pelo qual leptina, IGF1 e grelina interagem com o cérebro, para regular a atividade dos neurônios de GnRH, ainda não está completamente esclarecido. Informações atuais indicam que a leptina e o IGF1 estimulam a secreção de GnRH, enquanto a grelina apresenta efeito supressor. Receptores para IGF1 são encontrados em neurônios de GnRH e podem influenciar diretamente na secreção de GnRH (DIVALL et al., 2010). A positiva ação da leptina sobre o GnRH é mediada pelos neuropeptídios, Kisspeptina, peptídeo semelhante a galanina (GALP) e pro-opiomelanocortina (POMC, precursor of  $\alpha$ -MSH, GOTTSCH et al., 2004; CROWN et al., 2007). A ação negativa da grelina é mediada pelo neuropeptídeo Y (LEBRETHON et al., 2006). Um modelo de transição para a puberdade em novilhas propõe que, antes da puberdade, ocorre predomínio da ação da Grelina e NPY (Fig. 3), mediando uma supressiva ação sobre os neurônios de GnRH (ROA et al., 2010). Com o crescimento das novilhas ocorre depósito de tecido adiposo que estimula a produção de leptina pelos adipócitos, que conjuntamente com a kisspeptina, GALP e POMC, iniciam ação estimulatória sobre os neurônios GnRH. Durante a transição da fase pré-púbere para púbere, com o aumento da dominância da ação endócrina da leptina (Fig. 4), verifica-se aumento na secreção de GnRH e ativação do sistema reprodutivo endócrino da novilha (ROA et al., 2010; PERRY et al., 2016).

A sensibilidade do hipotálamo ao estradiol declina no momento que a novilha atinge a puberdade e é seguida pelo aumento de secreções gonadotróficas e início da atividade ovariana. Essa hipótese foi inicialmente testada em ratos e depois em novilhas (DAY et al., 1984). Dado o conhecimento atual a respeito do balanço dos sinais positivos e negativos nos neurônios GnRH, é possível que a puberdade ocorra com o aumento da secreção de gonadotrofinas como resultado da melhor ação estimulatória nos neurônios de GnRH, sem o envolvimento na sensibilidade ao feedback negativo ao estradiol (D'OCCHIO et al., 2019).

Figura 3. Modelo para a ação da grelina e da leptina durante o período de restrição (insuficiente; grelina) ou não (suficiente; leptina) de energia para conceituar o papel desses hormônios antes de depois da puberdade. Durante a fase de energia suficiente a leptina inicia sinais positivos nos neurônios de Kisspetina, enquanto que, durante a fase de energia insuficiente a grelina inicia sinais negativos nos neurônios Kiss/GnRH (Adaptado de Roa et al., 2010 e de D’Occhio et al., 2019).

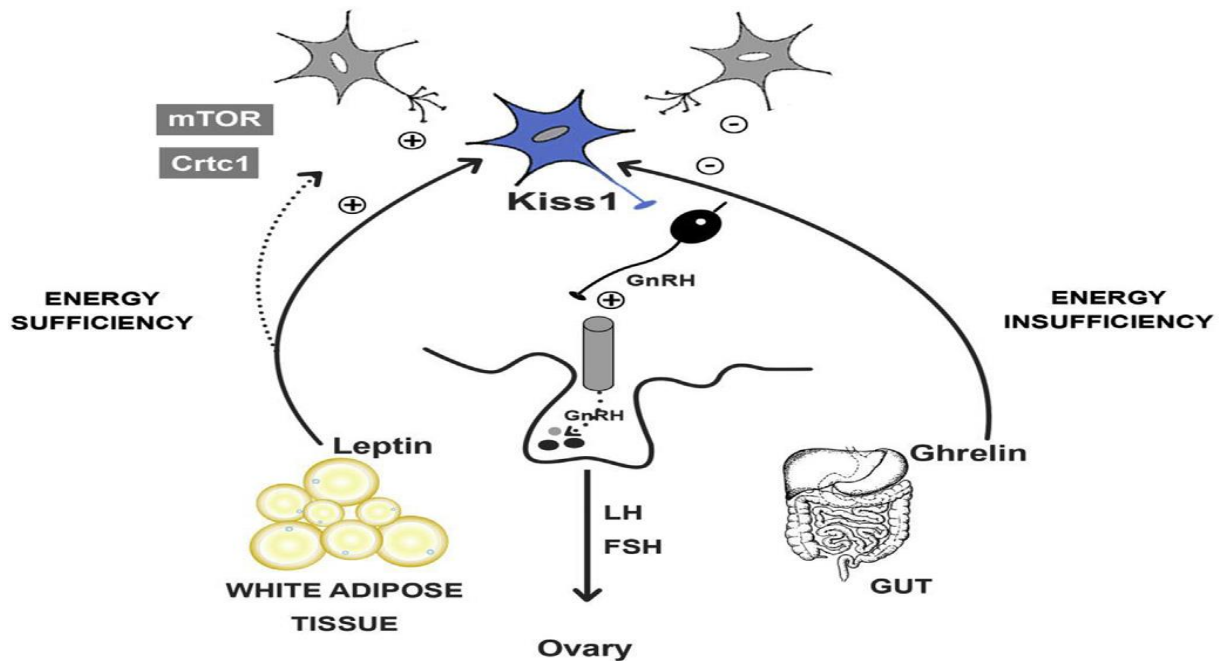
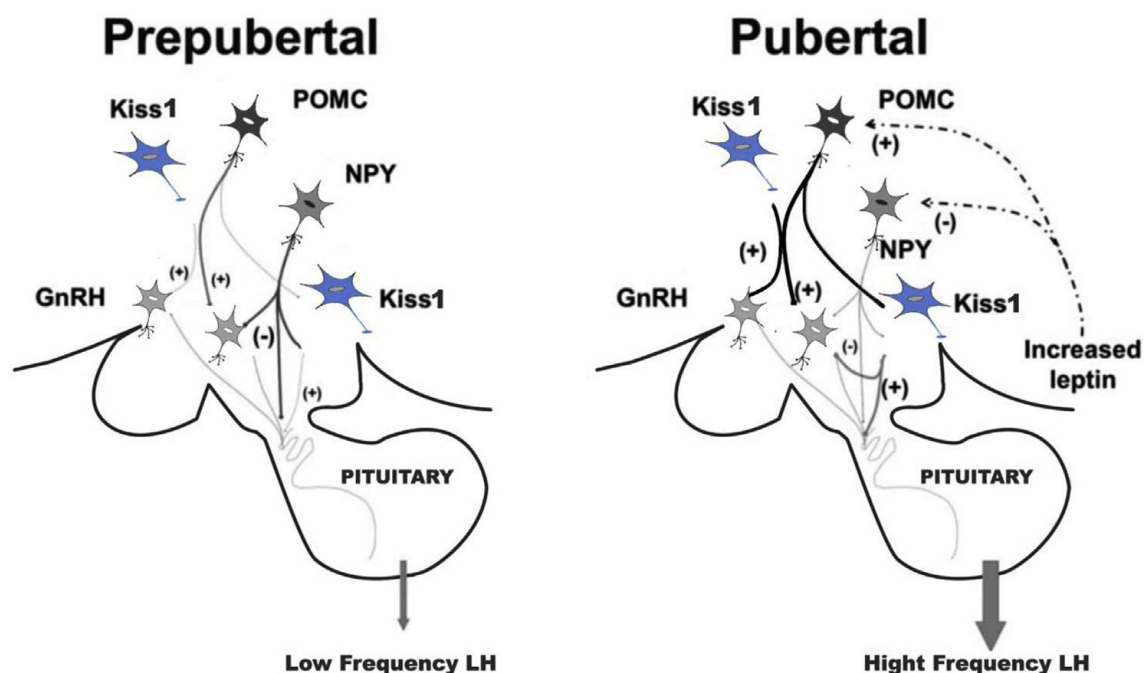


Figura 4. Modelo de inter-relação da leptina, kisspeptina, POMC e NPY durante a fase de transição de pré-púbere para púbere em novilhas. Durante o período púbere a leptina inicia forte aumento dos sinais positivos sobre neurônios Kiss 1 e POMC (Adaptado de Amstalden et al., 2014 e de D’Occhio et al., 2019).



Estudos evidenciaram que novilhas Nelores (*Bos indicus*) que receberam uma dieta de confinamento depois da desmama, alcançaram a puberdade mais cedo do que a média da raça (NEPOMUCENO et al., 2017). Melhorar a nutrição depois da desmama reduz à idade a puberdade em novilhas Nelore, independentemente da seleção genética para precocidade. Contudo, a puberdade ocorre mais cedo nas novilhas selecionadas geneticamente para precocidade sexual (FERRAZ JR et al., 2018), evidenciando a importância da nutrição e da genética na puberdade. Ainda, verifica-se que a nutrição e o ganho de peso vivo em novilhas jovens impactam a deposição subcutânea de tecido adiposo e ECC, com reflexos na reprodução de novilhas Nelore (BARUSELLI et al., 2017a). Foi verificado que o peso vivo (PV) na desmama e média de ganho diário (GMD) depois da desmama são indicadores de fertilidade futura da novilha (FERRELL et al., 1982; MONTEIRO et al., 2013). O tempo ideal para puberdade em novilhas Nelore requerem GMD de 0,6 e 0,7 kg/dia (FERRELL et al., 1982). Em novilhas (ROA et al., 2010; SAMADI et al., 2014) e vacas (VIZCARRA et al., 1998; SAMADI et al., 2013) a nutrição determina a homeostase no sistema metabólico e também regula a proporção de tecido adiposo e muscular.

Yelich et al. (1996), submetem novilhas desmamadas aos nove meses de idade a dietas de alto (1,36 Kg/d) ou baixo ganho (0,23 Kg/d) por 16 semanas. Após esse período todas as novilhas receberam a dieta de alto ganho. As novilhas que receberam a dieta de alto ganho nas primeiras 16 semanas alcançaram a puberdade precocemente, porém com menor peso. Essas novilhas apresentaram maior pulsatilidade de LH e maiores concentrações de insulina na circulação sanguínea. As novilhas que receberam dieta de baixo ganho nas primeiras 16 semanas apresentavam menores concentrações de IGF-1 e maiores concentrações de GH e, após o início do fornecimento da dieta de alto ganho, passaram a ter concentrações circulantes dos hormônios semelhantes às novilhas na dieta de alto ganho. Os autores concluíram que, mesmo após um período de restrição alimentar, o fornecimento de uma dieta que proporcione altas taxas de crescimento pode antecipar a puberdade, porém de forma menos eficaz quanto comparado às novilhas que apresentaram altos ganhos diários desde o desmame.



### 2.2.2 Hormônios esteroides e a relação com a puberdade em Novilhas

A exposição estratégica de novilhas pré-púberes à progesterona exógena pode ser uma alternativa para modular o hipotálamo, aumentando a secreção de gonadotrofinas (DAY, 1987; GRADEN et al., 1968; YAVAS E WALTON, 2000) e indução de puberdade (ANDERSON et al., 1996; CLARO et al., 2010; Grings et al., 1998; HALL et al., 1997; IMWALLE et al., 1998) em novilhas. Estudos evidenciaram que a exposição de novilhas Nelore (*Bos indicus*) a uma fonte de progesterona, antes do início da estação de monta, pode aumentar ciclicidade e o número de novilhas prenhes no começo da estação de monta. Em novilhas (*Bos indicus*), o tratamento com P4 via intravaginal libera P4 em concentrações fisiológicas que colabora para que as fêmeas alcancem a puberdade e apresentem melhora na taxa de serviço no início da estação de monta (CLARO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013).

Sá filho et al. (2015) realizaram uma série de experimentos para entender o efeito do tratamento com progesterona e estradiol na resposta a indução de ciclicidade e na taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore (*Bos indicus*). No primeiro experimento, as novilhas foram divididas para receber um dispositivo de P4 novo (1,9g), um dispositivo de P4 (1,9g) usado por três vezes e um grupo controle (sem dispositivo). Os dispositivos foram mantidos por 10 dias e avaliações ultrassonográficas foram realizadas para avaliar a resposta aos tratamentos. Ambos os grupos tratados com P4 apresentaram concentração plasmática de P4 acima de 1 ng/ml pelo menos durante os primeiros 7 dias de tratamento. Verificou-se aumento da taxa de ovulação ( $P = 0.04$ ) nas novilhas tratadas com dispositivo de P4 (PI = 30.0% (3/10) e UPI = 55.6% (5/9)], quando comparadas com as novilhas não tratadas [Controle = 0.0% (0/8)]. No segundo e terceiro experimento, Sá filho et al., (2015) avaliaram a adição ou não de BE no início do protocolo (ambos com BE no final do protocolo) e a resposta da indução da ovulação utilizando BE ou CE ao término do protocolo de indução de ciclicidade, respectivamente. A adição de BE no início do protocolo, não melhorou as taxas de ovulação e de prenhez à IATF ( $P > 0,05$ ). As novilhas tratadas com CE e BE como indutores de ovulação apresentaram semelhantes taxas de ovulação ( $P > 0,05$ ). Entretanto, as novilhas

tratadas com CE apresentaram maior taxa de prenhez à IATF ( $P < 0,05$ ). No quarto e último experimento dos estudos realizados por Sá filho et al., (2015), novilhas sem CL no início do tratamento foram distribuídas para receber ou não um dispositivo intravaginal de P4 de 4º uso e 0,5mg de CE. Novilhas do grupo controle (não tratadas) apresentaram menores taxas de ovulação e de prenhez à IATF ( $P < 0,05$ ). Sá filho et al. (2015) concluíram que a combinação de um dispositivo de P4 utilizado pela 4ª vez, somado a adição de estradiol (BE ou CE) ao término do protocolo de indução são eficazes em aumentar a ciclicidade de novilhas no início da estação de monta, sendo a indução da ovulação com CE capaz de melhorar os resultados na taxa de prenhez à IATF. Esses efeitos são possivelmente relacionados a modulação do hipotálamo pela progesterona e aumento da secreção de GnRH (DAY, 1987; GRADEN et al., 1968; YAVAS E WALTON, 2000).

Corroborando com Sá filho et al. (2015), Claro et al. (2010) avaliaram escore uterino de novilhas Nelore tratadas por 12 dias com dispositivo de P4 novo (1,9g) e usado por 24 dias, e observaram menor nota de escore uterino (UtS) nas novilhas tratadas com dispositivo novo quando comparado com novilhas tratadas com dispositivos usado [(1,88 vs 2,24, UtS=1, <20mm, UtS=2, >20mm, UtS=3, >20mm e forte tônus uterino)  $P < 0,05$ ]. Rodrigues et al. (2013), em um de seus experimentos, verificaram a adição de eCG ao término do protocolo de indução de ciclicidade. Os autores verificaram que a adição de eCG ou ECP e especialmente a combinação de eCG+ECP aumentaram a detecção de cio e a taxa de ovulação, com subsequente aumento na taxa de prenhez.

### 2.3 RELAÇÕES ENTRE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) E DESEMPENHO NA IATF DE NOVILHAS

A aplicação da eCG no momento da remoção do dispositivo de progesterona tem sido frequentemente utilizada em programas de IATF a base de P4 + estradiol em rebanhos *Bos indicus* (BARUSELLI et al., 2004) e em rebanhos *Bos taurus* (BÓ et al., 2002a) que apresentam elevada incidência de anestro pós-parto. Provavelmente o mais importante efeito da eCG é estimular o crescimento do folículo dominante que conseqüentemente aumenta a taxa de

ovulação (SÁ FILHO et al., 2010a), especialmente em vacas em anestro pós-parto e/ou com baixa condição de escore corporal (BÓ et al., 2002; BÓ et al., 2007; SALES et al., 2011).

Além disso, o tratamento com eCG aumenta a concentração circulante de P4 no ciclo estral subsequente (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010b), que foi associado a aumento do diâmetro do CL (BÓ et al., 2002) e a aumento da produção de P4 pelo próprio CL. Em novilhas *Bos indicus* submetidas a programas de IATF, o uso da eCG no momento da remoção do dispositivo liberador de P4 tem sido uma alternativa para aumentar a resposta ovulatória (BARUSELLI et al., 2004b) e a taxa de prenhez (DIAS et al., 2009; MARQUES et al., 2005; MENEGHETTI et al., 2008).

Dados de Sá filho et al. (2010a), mostrados abaixo na tabela 1, resumem os efeitos positivos da eCG, em um experimento no qual as novilhas Nelore receberam ou não 400UI de eCG no momento da remoção do dispositivo de P4.

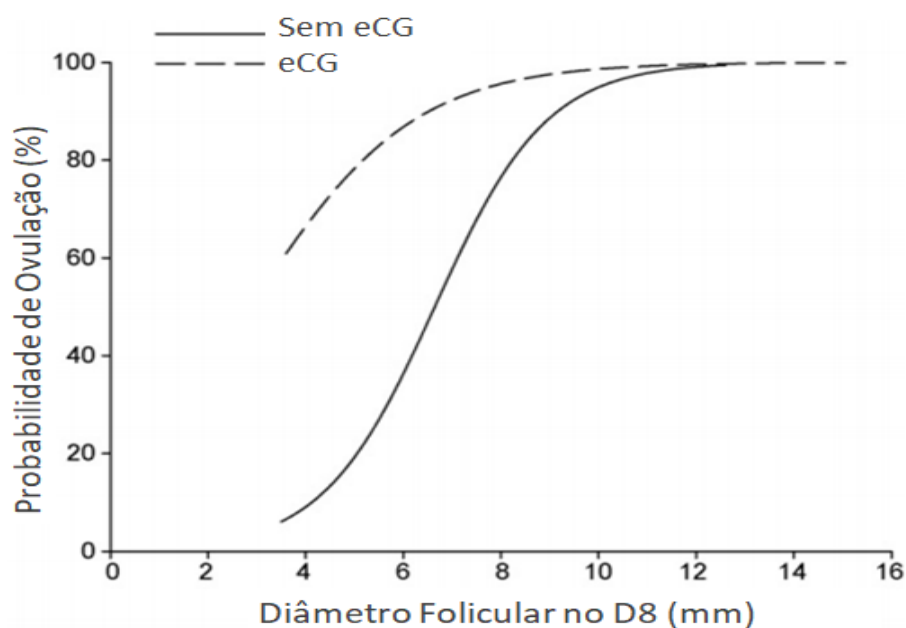
Tabela 1. Efeito do tratamento da eCG na remoção do implante de P4 sobre a dinâmica folicular, função luteal e taxa de prenhez à IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante de norgestomet e benzoato de estradiol (adaptado de Sá Filho et al., 2010a).

	<b>0UI</b>	<b>400UI</b>	<b>Valor P</b>
Número de animais	87	90	-
Diâmetro maior folículo no D8 (mm)	8.2±0.2	8.6±0.2	0.22
Diâmetro maior folículo no D10 (mm)	9.5±0.2	10.6±0.2	0.003
Taxa de crescimento do D8 para o D10 (mm/dia)	0.6±0.1	1.1±0.1	0.0009
Taxa ovulação (%)	73.6 (64/87)	94.4(85/90)	0.0006
Diâmetro do CL 5 dias após IATF (mm)	13.8±0.3	15.5±0.3	0.0002
Concentração de P4 5 dias após IATF (ng/ml)	3.6±0.7	6.6±1.0	0.0009
Concentração de P4 em novilhas ovuladas (ng/ml)	4.8±1.0	6.9±1.0	0.02
Taxa de prenhez à IATF (%)	36.8 (32/87)	50.0 (45/90)	0.04
Taxa de prenhez à IATF somente nas ovuladas (%)	50.0 (32/64)	52.9 (45/85)	0.62

Nos dados da tabela acima evidenciam que novilhas tratadas com eCG apresentam maior taxa de crescimento folicular do maior folículo do D8 ao D10, maior diâmetro folicular no D10, maior CL 5 dias após a IATF e maior taxa de

ovulação. Verificou-se, também, incremento na probabilidade de ovulação ao final do protocolo de sincronização somente nas novilhas que apresentavam folículos de tamanho pequeno ou médio (4-8mm de diâmetro) no momento do tratamento com eCG (D8; Gráfico 1).

Gráfico 1. Gráfico da probabilidade de ovulação em novilhas Nelore tratadas (linha fixa) ou não (linha pontilhada) com eCG, de acordo com o diâmetro do maior folículo no D8. A administração de eCG aumentou a probabilidade de ovulação no final do protocolo somente em novilhas com folículos pequenos ou médios (4-8mm de diâmetro) no momento da remoção do implante (D8) (Adaptado de Sá Filho et al., 2010a).



Outros estudos também evidenciaram aumento na taxa de ovulação em novilhas *Bos indicus* tratadas com eCG [76% (16/21) para as tratadas e 50% (10/20) para as não tratadas; BARUSELLI et al., 2004b].

Uma correlação positiva entre as concentrações séricas de P4 no diestro e as taxas de prenhez tem sido descrita em bovinos (BINELLI et al., 2001; BÓ et al., 2002; THATCHER et al., 2001). Vários autores consideram o uso da eCG como uma potente ferramenta para aumentar a concentração plasmática de P4 no ciclo estral subsequente a IATF (Baruselli et al., 2000; Fuentes e De la Fuente, 1997). De acordo com sugestões de Marques et al. (2003) e Baruselli et al. (2004a), esse aumento das concentrações circulantes de P4 é devido ao efeito luteotrófico da eCG. Em vacas tratadas com eCG na remoção do

dispositivo intravaginal de P4, conforme descrito por Rigoglio et al. (2013), ocorre aumento na quantidade de células luteais grandes no CL, que estão associadas ao aumento na produção de P4 pelo CL.

No estudo de Sá Filho et al. (2010a) o tratamento com eCG melhorou a concentração circulante de P4, tanto em todas as novilhas tratadas como somente nas novilhas que ovularam. Essas observações também foram encontradas nos estudos de Baruselli et al. (2004b) com novilhas Nelore (*Bos indicus*). Contudo, vale ressaltar que quando somente novilhas que ovularam foram consideradas, a taxa de prenhez à IATF não foi influenciada pelo tratamento com eCG. Esses dados suportam que o efeito da eCG sobre a taxa de crescimento folicular, diâmetro do folículo no momento da IATF e taxa de ovulação podem ser mais relevantes para a fertilidade que o efeito luteotrófico em novilhas *Bos indicus*.

Como reportado, o tratamento com eCG aumenta o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF. Estudos evidenciaram que o diâmetro do folículo ovulatório é um indicador de maturidade folicular e da fertilidade em *Bos taurus* (MUSSARD et al., 2007; PERRY et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2001) e fêmeas *Bos indicus* (DIAS et al., 2009; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2008a,b).

#### 2.4 RELAÇÕES ENTRE A DURAÇÃO DO DISPOSITIVO D PROGESTERONA E A TAXA DE PLENHEZ À IATF

Existem três fatores importantes para o sucesso dos programas de sincronização da ovulação para IATF. Primeiro, é a emergência da nova onda de crescimento folicular e o controle do desenvolvimento do folículo dominante, para que, no final do protocolo, um folículo com tamanho de crescimento adequado, esteja disponível para ovulação (BÓ et al., 1995; MADUREIRA et al., 2020). Segundo, a duração do tempo de exposição à progesterona (intervalo entre a inserção e a remoção da fonte de P4, variando de 5 a 9 dias; BRIDGES et al. 2008; MENEGHETTI et al., 2009). Terceiro, no final do protocolo, a remoção da exposição a P4, deve ser precisa e sincronizada (DIAZ et al., 2002; BORCHARDT et al., 2018), para que o folículo dominante tenha condições de

crescer e ovular e para promover um ambiente uterino adequado para fertilização e manutenção da gestação (PURSLEY et al., 1998).

Prata et al. (2020) em seus estudos, compararam os resultados reprodutivos de protocolos de IATF a base de E2/P4 com diferentes durações no tratamento com dispositivos intrafaginais de P4 (7, 8 ou 9 dias). Os autores compararam 7 ou 8 dias de duração em novilhas e em vacas solteiras, múltiparas e primíparas (Experimento 1). No Experimento 2, os autores compararam 7 ou 9 dias em vacas solteiras e múltiparas. Os dados estão apresentados na tabela 2 (adaptado de Prata et al., 2020).

Tabela 2. Relação entre a duração dos protocolos de sincronização (7, 8 ou 9 dias de exposição ao dispositivo de P4) e a administração de GnRH no momento da IATF, na expressão do estro e na taxa de prenhez à IATF (adaptado de Prata et al., 2020).

	7 Dias		8 ou 9 dias		Valores de P		
	S/GnRH	GnRH	S/GnRH	GnRH	Duração <sup>1</sup>	GnRH <sup>2</sup>	D*G
<b>Novilhas (7x8dias)</b>							
Estro,% (n/n)	97.0 (360/371)		98.1 (364/371)		0.34	-	-
Prenhez IATF,% (n/n)	46.9 (90/192)	51.4 (92/179)	47.7 (84/176)	43.6 (85/195)	0.34	0.96	0.24
<b>Vacas (7x8dias)</b>							
Estro,% (n/n)	65.8 (769/1168)		72.0 (842/1170)		<0.01	-	-
Prenhez IATF,% (n/n)	55.9 (331/592)	60.9 (351/572)	56.2 (331/589)	60.8 (353/581)	0.98	0.02	0.91
<b>Vacas (7x9dias)</b>							
Estro,% (n/n)	54.7 (382/699)		71.3 (459/644)		<0.01	-	-
Prenhez IATF,% (n/n)	47.6 <sup>A</sup> (170/357)	57.9 <sup>B</sup> (198/342)	54.6 <sup>AB</sup> (331/592)	55.4 <sup>AB</sup> (331/592)	0.43	0.04	0.08

A,B Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ( $P > 0.05$  and  $\leq 0.1$ ).

1D, Duração.

2G, GnRH.

Os resultados apresentados na Tabela 2 são indicativos de que a expressão de estro foi semelhante para novilhas submetidas a ambos os protocolos (7 ou 8 dias; média de 97,3%; 722/742). A taxa de prenhez à IATF também não foi afetada pela duração do protocolo de sincronização [49,1% (182/371) vs. 45,6% (169/371), para 7 e 8 dias, respectivamente], ou pelo tratamento com GnRH no momento da IATF [sem GnRH = 47,3% (174/368) vs. com GnRH = 47,3% (177/374)] e não houve interação entre a duração do protocolo e o tratamento com GnRH na taxa de prenhez à IATF.

Em vacas foi verificado que a duração do protocolo (7 vs 8 dias) influenciou a expressão de estro, mas não houve interação ( $P=0.91$ ) entre a duração do estro e o tratamento com GnRH na taxa de prenhez à IATF. O protocolo com 8 dias de duração aumentou a porcentagem de vacas detectadas em estro (72,0%;842/1170) quando comparado com o protocolo de 7 dias (65,8%; 769/1168). Entretanto, a duração do protocolo não influenciou a prenhez à IATF ( $P=0.98$ ) e não houve interação estro e tratamento com GnRH na taxa de prenhez à IATF ( $P=0.91$ ; Tabela 2).

Portanto, o protocolo 7 dias de duração teve similar taxa de prenhez à IATF quando comparado ao protocolo de 8 dias [7 d = 58,4% (682/1168) vs 8 d = 58,5% (684/1170);  $P=0,98$ ]. Entretanto, o tratamento com GnRH no momento da IA apresentou efeito positivo na taxa de prenhez [sem GnRH = 56,1 (662/1181) vs com GnRH = 60,9% (704/1157);  $P=0.02$ ]

Comparando protocolos com 7 ou 9 dias de duração em vacas, foi verificado maior ( $P < 0.01$ ) porcentagem de vacas foram detectadas em estro no protocolo de 9 dias comparado com o de 7 dias [71,3 (459/644) vs. 54,7% (382/699);  $P < 0.01$ ; Tabela 2]. Encontrou-se tendência de interação entre a duração do protocolo e o tratamento com GnRH no momento da IA na taxa de prenhez ( $P=0.08$ ). O grupo 7 dias com GnRH, apresentaram maior taxa de prenhez quando comparado ao grupo 7 dias sem GnRH. Além disso, os grupos com 9 dias, com ou sem GnRH, tiveram resultados intermediários que não foram diferentes dos outros tratamentos (Tabela 2). No entanto, as análises independentes de efeitos indicaram que ambos os protocolos tiveram taxa de prenhez similares [7 dias = 52,7% (368/699) vs 9 dias = 55,0% (354/644);  $P=0.40$ ] e o tratamento com GnRH melhorou a taxa de prenhez à IATF [sem GnRH = 50,9 (343/674) vs com GnRH = 56,7% (379/669);  $P=0.03$ ].

Foi demonstrado que o tempo de exposição de P4 pode mudar o padrão de desenvolvimento do folículo dominante, e conseqüentemente, afetar o tamanho do folículo pré-ovulatório, expressão de estro e os resultados de fertilidade dos programas de sincronização para IATF (CARVALHO et al., 2002).

Existe na literatura estudos que discutem a possibilidade de que um protocolo curto a base progesterona e estradiol poderiam apresentar comprometimentos na fertilidade devido a reduções na taxa de expressão de

estro e no diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da IATF. Sá Filho et al. (2010) verificaram que vacas zebuínas com folículos <7,5mm tiveram taxa de prenhez inferiores quando comparadas a vacas com folículos acima de 11,1mm. Por outro lado, um protocolo mais longo (9 dias de permanência do dispositivo de P4) poderia apresentar fertilidade reduzida devido ao *turnover* do folículo dominante da onda folicular sincronizada (MADUREIRA et al., 2020), antes da diminuição controlada da P4 circulante.

Existem ainda na literatura científica questionamentos sobre os detalhes dos protocolos de sincronização para IATF principalmente em novilhas zebuínas, justificando novos estudos nessa importante área do conhecimento que proporciona a aplicação eficiente das biotecnologias da reprodução.



### **3 EXPERIMENTO 1 – PROGESTERONA INJETÁVEL PODE SER UTILIZADA PARA A INDUÇÃO DE CICLICIDADE EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE (*BOS INDICUS*)**

#### **3.1 OBJETIVO**

- ✓ Comparar a eficiência do protocolo de indução de ciclicidade utilizando P4 injetável de longa duração ou um dispositivo intravaginal de P4 de 4º uso em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

#### **3.2 HIPÓTESE**

A P4 injetável (Sincrogest injetável® Ourofino Saúde Animal) tem a mesma eficiência no perfil de liberação de P4, na taxa de indução de ciclicidade e na taxa de prenhez à IATF quando comparadas com um dispositivo intravaginal de P4 (sincrogest® Ourofino Saúde Animal) de 4º uso. As Novilhas tratadas para indução de ciclicidade (P4 injetável ou Dispositivo de P4), apresentam semelhantes taxas de prenhez quando comparadas às novilhas ciclando.

#### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 2492220119).

##### **3.3.1 Local e período de execução**

O projeto foi executado durante o período de Agosto de 2019 a Junho de 2020. O Experimento foi realizado na Fazenda Santa Vera, localizada no município de Barra do Garças-MT.

### 3.3.2 Animais e instalações

Durante todo o experimento 992 novilhas Nelore (*Bos indicus*) foram mantidas nos pastos de *brachiaria brizantha*, com acesso a água *ad libitum*. As novilhas permaneceram neste sistema durante todo o experimento, com somente idas ao curral no manejo de rotina, para as coletas de dados e execução do experimento.

### 3.3.3 Delineamento experimental

As 992 novilhas Nelore apresentavam  $3,42 \pm 0,15$  de escore de condição corporal e  $24,0 \pm 3,10$  meses de idade. Destas, 557 foram diagnosticadas sem a presença de corpo lúteo em avaliação ultrassonográfica realizada 24 dias antes do início do protocolo de IATF (D-24), sendo que 21 delas formaram um subgrupo para colheitas de sangue. O restante das novilhas (n=414) foram consideradas ciclando (presença de corpo lúteo). No D-24, um total de n= 971 animais foram divididos em: Grupo Dispositivo de P4 de 4º uso (n= 281), que receberam por 12 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias; Grupo P4 Injetável (Sincrogest Injetável®; n= 276), que receberam 150mg de P4 injetável de longa ação e; Grupo Ciclando, n=414, sem tratamento hormonal. Após 12 dias (D-12), nos grupos Dispositivo de P4 e P4 Injetável, aplicou-se de 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m (CE). No Grupo Ciclando não houve nenhum tratamento hormonal. No primeiro dia do protocolo de sincronização (D0), os animais receberam tratamento com 2,0 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE), associado a 0,530 mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ), inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) previamente utilizado por 8 dias e uma avaliação por ultrassonografia, para verificar ausência ou presença de CL. Após oito dias (D8) foi realizada a remoção do dispositivo de P4 em todos animais foram tratados com 0,530 mg i.m. de PGF2 $\alpha$ , cipionato de estradiol (CE) 0,5 mg i.m, e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) i.m. A IATF foi realizada 48 horas após, no D10 do protocolo. A taxa de prenhez foi confirmada 30 dias após à IATF (D40). Juntamente no D-24, o subgrupo de 21 animais sem CL em duas avaliações (D-30 e D-24), realizou-se a colheita de

sangue. Neste momento (D-24) as novilhas foram separadas em quatro grupos experimentais: 1) Grupo Controle: não receberam tratamentos hormonais; 2) Grupo InjD10: receberam 1,0mL (150mg, Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação no D-22; 3) Grupo InjD12: receberam 1,0mL (150mg, Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação no D-24. 4) Grupo DispD12: receberam um dispositivo intravaginal (Sincrogest®, P4) previamente utilizado por 24 dias no D-24. Coletas de sangue e análises US foram realizadas pontualmente no dia D-24 e diariamente entre os dias D-14 e D-10. O dispositivo de P4 foi removido no D-12, mesmo momento em que as novilhas de todos os Grupos receberam 0,5mg de cipionato de estradiol (CE, SincroCP®, Ourofino Saúde Animal).

Na figura 5 está apresentado delineamento experimental do subgrupo de novilhas (n=21) para avaliação das concentrações plasmáticas de P4 e na figura 6 está apresentado o delineamento experimental com 971 novilhas para avaliação da resposta aos tratamentos de indução de ciclicidade.

Figura 5. Delineamento experimental do subgrupo de novilhas Nelore (*Bos indicus*; n=21) utilizadas para avaliar as concentrações plasmáticas de progesterona: 1) Grupo Controle: não receberam tratamentos hormonais; 2) Grupo InjD10: receberam 150mg de P4 injetável de longa ação (1,0mL de Sincrogest Injetável®) no D-22; 3) Grupo InjD12: receberam 150mg de P4 injetável de longa ação (1,0mL de Sincrogest Injetável®) no D-24; 4) Grupo DispD12: receberam um dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado (Sincrogest®, P4) por 24 dias no D-24,.

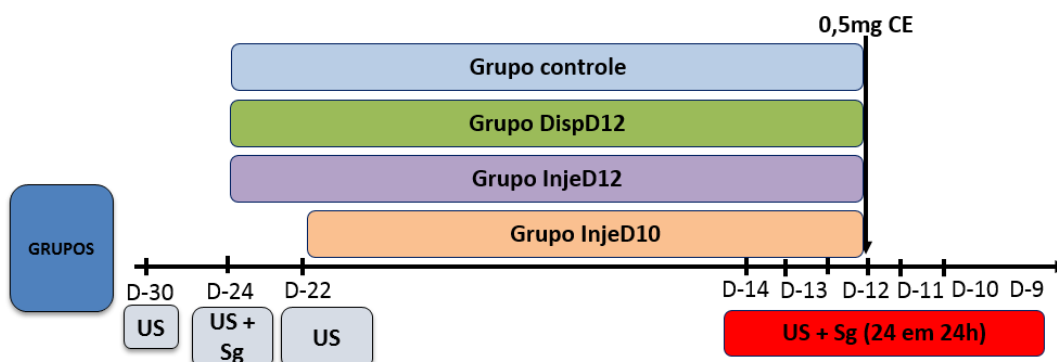
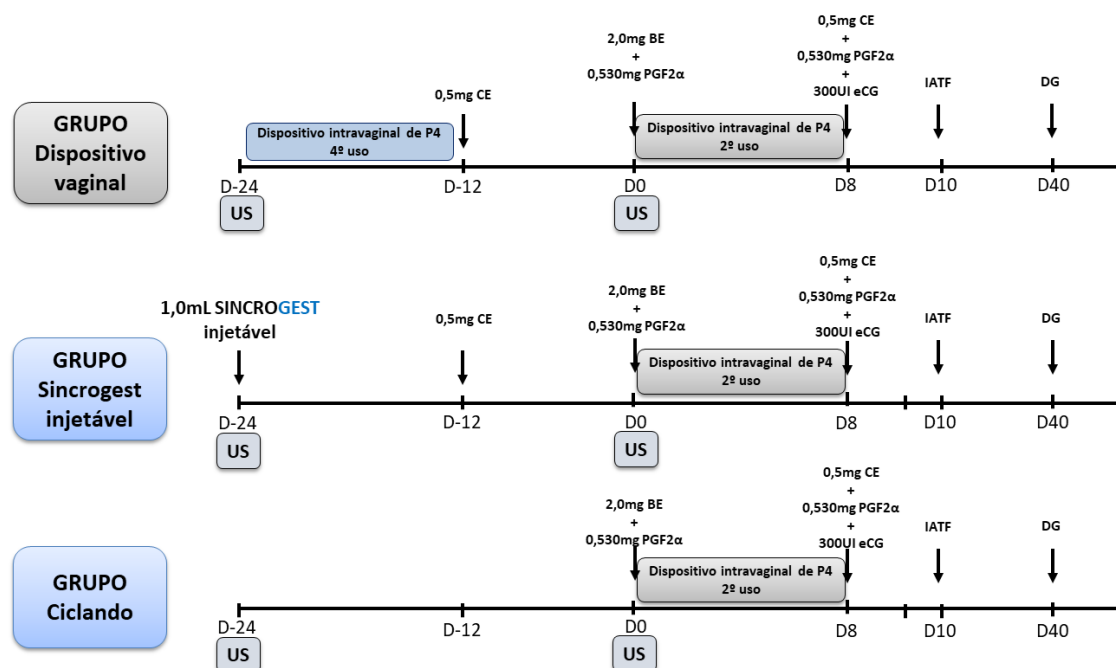


Figura 6. Delineamento experimental dos grupos de novilhas Nelore (*Bos indicus*; n= 971) utilizadas para avaliar a resposta aos protocolos de indução de ciclicidade: 1) Grupo DispD12: no D-24 as novilhas receberam um dispositivo intravaginal previamente utilizado por 24 dias (Sincrogest®, P4) e no D-12 receberam 0,5mg de CE; 2) Grupo InjD12: no D-24 as novilhas receberam 150mg de P4 injetável de longa ação (1,0mL Sincrogest Injetável®) e no D-12 receberam 0,5 mg de CE; 3) Grupo Ciclando: as novilhas não receberam nenhum tratamento prévio a IATF.



### 3.3.4 Avaliações ultrassonográficas

Todas as fêmeas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência de 7,5 MHz (DP10, Mindray, China) no D-30, D-24 e D0 para avaliar a situação reprodutiva dos animais (pré-púbere ou púbere) pela presença ou não de um corpo lúteo (CL), e no D40 para realizar o diagnóstico de gestação.

### 3.4 COLHEITAS DE SANGUE

Nos dias -24, -14, -13, -12, -11, -10 e -9 foram realizadas colheita de sangue para análise da concentração plasmática de P4. Com os animais foram

contidos no brete e foi realizada a punção da veia sacrococcígea para colheita de sangue em tubos a vácuo contendo fluoreto de sódio (4 mL; Vacutainer, Becton-Dickinson e Company, EUA)

O plasma foi separado por centrifugação durante 15 minutos. (3500 rpm por 15 minutos, Centrífuga Excelsa Baby, Fanem, Brasil) e depois acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) com identificação. Em seguida os tubos foram armazenados em freezer a  $-21^{\circ}\text{C}$  até posterior análise da concentração plasmática de P4.

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Informações de cada Novilha foram compiladas em planilhas para análise estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) através do pacote Enterprise Guide (v 7.1).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), no qual os dados foram homogeneizados e distribuídos entre os grupos. As variáveis avaliadas foram indução de ciclicidade, taxa de prenhez e concentração de progesterona. Para a taxa de ciclicidade, no modelo incluiu os efeitos de tratamento (Grupo Dispositivo de 4<sup>o</sup> uso e Grupo injetável), ECC e fazenda.

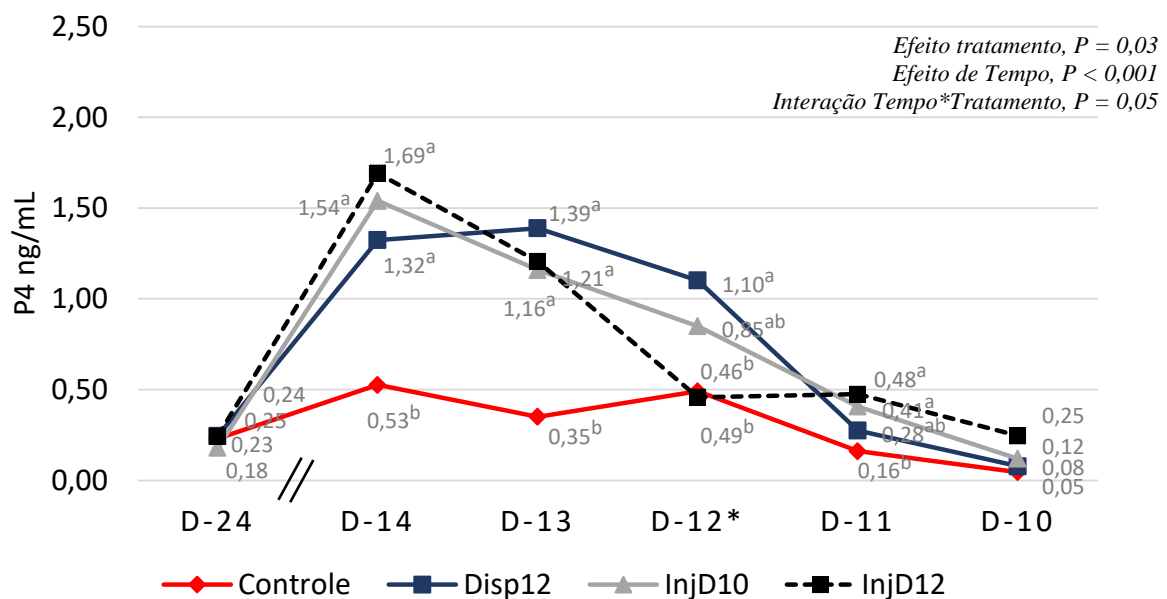
Para a taxa de prenhez, no modelo incluiu os efeitos de tratamento (Grupo Dispositivo de 4<sup>o</sup> uso e Grupo injetável), ciclicidade no D0 e fazenda. Tais variáveis foram analisadas como dados binomiais utilizando o procedimento Glimmix do SAS. Variável contínua, como concentração de progesterona foi testada quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE (transformado quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para determinar diferença entre os grupos experimentais. Para a concentração de progesterona, as variáveis inicialmente inclusas no modelo foram tratamento (Controle, Dispositivo 4<sup>o</sup> uso, injetável 10dias e injetável 12dias), tempo e interação.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5% ( $P \leq 0,05$ ) e tendência quando  $P = 0,10$ .

### 3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao perfil plasmático de P4, estão representados no gráfico 2.

Gráfico 2. Perfil plasmático de P4 no início dos tratamentos (D-24), 10 e 12 dias após o início dos tratamentos (D-14 e D-13), no momento do tratamento com 0,5mg de CE (D-12) e um (D-11) e dois (D-10) dias após o tratamento com CE. Grupo Dispositivo 4º uso (Disp12; n= 6) que receberam por 12 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias; Grupo Injetável (Sincrogest Injetável®) que receberam 150mg de P4 injetável de longa ação por 10 (InjD10; ; n= 5) ou 12 dias (InjD12; n= 5) e Grupo controle que não receberam tratamento (Controle; n=5) .



\*momento da remoção do dispositivo e aplicação de 0,5mg CE

Os dados de resposta à indução de ciclicidade e de taxa de prenhez estão apresentados no gráfico 3 e 4, respectivamente. No gráfico 5, verifica-se o efeito dos tratamentos de indução de ciclicidade na taxa de prenhez à IATF.

Gráfico 3. Taxa (%) de resposta à indução de ciclicidade avaliada no D0 do protocolo de IATF (presença de CL) no Grupo Dispositivo P4 de 4º uso (n= 281), no Grupo P4 Injetável (150mg; n=276) e no grupo ciclando (n=414) em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

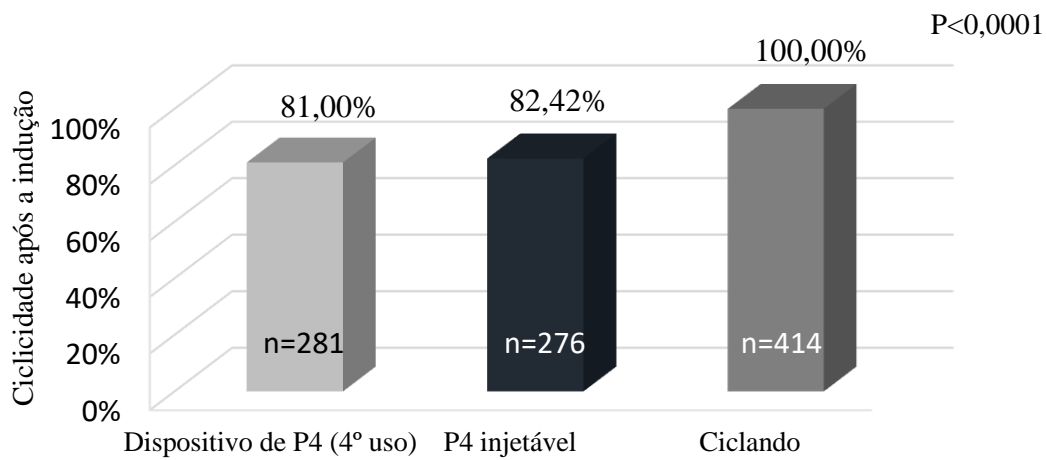


Gráfico 4. Taxa de prenhez (%) 30 dias após a IATF nos Grupos Dispositivo P4 de 4º uso (n=281), P4 Injetável I (150mg de Sincrogest Injetável®; n=276) e Grupo Ciclando (sem tratamento hormonal; n= 414) em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

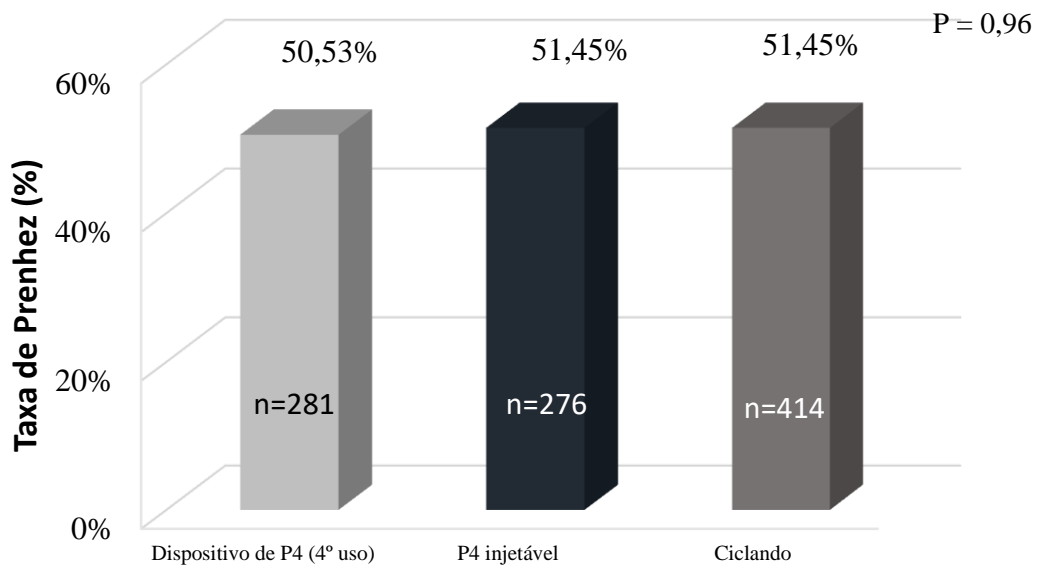
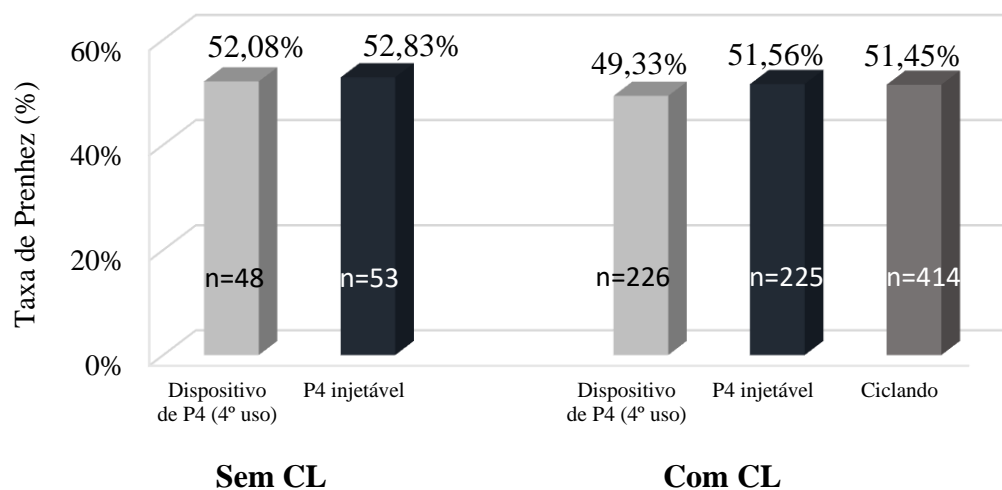


Gráfico 5. Taxa de prenhez (%) à IATF conforme ciclicidade (presença de CL) no D0 (início do protocolo de sincronização) em novilhas Nelore que receberam tratamento para indução de ciclicidade com dispositivo intravaginal de P4 ou com P4 injetável de longa ação.



Os resultados desse estudo evidenciam a importância da exposição estratégica à P4 exógena previamente ao protocolo de IATF em novilhas Nelore. Verificou-se que a taxa de resposta à indução de ciclicidade e a taxa de prenhez à IATF foram semelhantes entre os tratamentos, evidenciando taxas semelhantes ao do grupo de novilhas ciclando. Os efeitos positivos dos tratamentos foram evidenciados para as duas fontes de P4 exógenas utilizadas (dispositivo intravaginal e tratamento intramuscular com P4 injetável de longa ação). Notou-se, ainda, que as novilhas que apresentaram resposta ao tratamento de indução de ciclicidade (presença de CL no D0) apresentaram mesma taxa de prenhez à IATF quando comparadas com as novilhas com ausência de CL no início do protocolo. Esse efeito positivo foi verificado independente da fonte de P4 utilizada, indicando que a indução com Dispositivo de P4 ou P4 injetável pode ser recomendada para indução de ciclicidade em novilhas Nelore que irão ser inseminadas em tempo fixo. Esses resultados confirmam a hipótese inicial do presente estudo.

Anderson et al. (1996) reportaram que o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 por nove dias foi eficiente para desencadear a puberdade em 81% das novilhas. Esse fato foi associado ao aumento da liberação de LH



em decorrência do tratamento com da P4 (BERARDINELLI et al., 1979; ANDERSON et al., 1996), que proporcionou maior crescimento folicular que, por sua vez, induziu aumento na produção de estrógeno e maior desenvolvimento uterino.

Durante o período de tratamento com P4 ocorre inibição da liberação de LH de forma semelhante ao que ocorre no ciclo estral de fêmeas maduras, demonstrando, que os mecanismos relacionados a essa inibição já estão presentes em novilhas pré-púberes. O mecanismo responsável pelo aumento da secreção de LH após a aplicação da P4 estaria ligado à redução no número de receptores de estrógeno no hipotálamo anterior e no hipotálamo médio basal durante o período do tratamento. Após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, houve liberação de LH e maior crescimento folicular, indicando que ocorreu a redução do efeito negativo do estrógeno sobre a liberação de LH (ANDERSON et al., 1996).

Sá Filho et al. (2015) realizaram uma série de experimentos avaliando os efeitos do tratamento com P4 e E2 antes da estação reprodutiva de novilhas Nelore. Os autores dosaram a concentração plasmática de P4 durante o tratamento de indução de ciclicidade e encontraram concentrações acima de 1ng/ml na corrente sanguínea nos primeiros 7 dos 10 dias de tratamento com o uso de dispositivos intravaginais contendo 1,9g de P4 novos ou reutilizados. O gráfico 2 do presente estudo corrobora com os dados de Sá Filho et al. (2015) no qual se verifica que a concentração plasmática de P4 permaneceu acima de 1ng/ml por 11 dias nos grupos de Novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P4 ou P4 injetável de longa ação. Sá Filho et al. (2015) também verificaram que a taxa de resposta (animais com CL) ao tratamento com P4 foi de 83,3%, superior à do do grupo controle (sem tratamento; 60.7%). Os pesquisadores verificaram que a redução na taxa de ciclicidade refletiu diretamente na taxa de prenhez à IATF (51,9% vs 43,6% para animais tratados ou não para indução de ciclicidade, respectivamente).

No presente estudo a taxa de resposta ao tratamento com P4 (presença de CL) foi de 81,5% e a taxa de prenhez à IATF de 51,0%. Esses resultados são muito semelhantes aos verificados por Sá Filho et al. (2015) quando analisado nos grupos que receberam tratamento.

Outro estudo com novilhas Nelore (LEMES et al., 2016) também comparou duas fontes diferentes de P4 (injetável e dispositivo intravaginal) ao grupo controle (sem tratamento). Os resultados apresentaram resposta semelhante à do presente estudo, com respostas semelhantes entre os animais tratados com P4 injetável e com dispositivo intravaginal de P4. Nesse estudo os grupos tratados apresentaram maiores taxas de indução de ciclicidade quando comparado com o grupo controle. Quando foi analisado o efeito do tratamento na taxa de prenhez à IATF, verificou-se que as novilhas tratadas com P4 injetável apresentaram maior fertilidade quando comparadas com as novilhas do grupo controle e uma tendência de melhora quando comparadas ao grupo tratado com dispositivo intravaginal de P4.

No presente estudo o tratamento para indução de ciclicidade com as duas fontes de P4 em novilhas pré-púberes apresentaram resultados de prenhez à IATF semelhantes aos observados em novilhas cíclicas. Dados de Rodrigues et al. (2016) corroboram com os do presente estudo e confirmam que a taxa de prenhez à IATF de novilhas (Nelore e cruzadas) submetidas ao tratamento de indução de ciclicidade não diferiu entre as Novilhas púberes (ciclando) e as novilhas pré-púberes tratadas com P4. Os autores também demonstraram que tanto as novilhas púberes como as novilhas tratadas para indução de ciclicidade que possuíam CL no início do protocolo de sincronização apresentaram maior taxa de prenhez à IATF que as novilhas pré-púberes que não responderam ao tratamento (sem CL no D0 do protocolo).

Conforme demonstrado por Rodrigues et al. (2016), a taxa de prenhez foi baixa nas novilhas pré-púberes induzidas que não apresentaram CL no D0 do protocolo para IATF. Essas novilhas não apresentavam ciclicidade após o tratamento e o comprometimento na taxa de prenhez à IATF pode estar associado à ausência do tratamento com eCG no protocolo de sincronização.

Carvalho et al. (2016), quando utilizaram eCG em novilhas sem a presença de CL no início do protocolo, não encontraram efeito da presença ou não de CL no D0 na taxa de prenhez à IATF (39,2%; 35,7%, respectivamente).

Os resultados do presente estudo corroboram com os dados de Carvalho et al. (2016), que também não verificaram diferenças dos grupos com ou sem CL no D0 quando tratadas com eCG no protocolo de sincronização,

ressaltando a importância da eCG na IATF de novilhas tratadas para indução de ciclicidade.

Os resultados do presente estudo evidenciaram efeitos semelhantes do tratamento para indução de ciclicidade com progesterona injetável de longa ação e com dispositivo intravaginal de progesterona em novilhas Nelore pré-púberes. Ambos os grupos tratados apresentaram eficiência semelhante quando comparados com novilhas ciclando. Essas informações reforçam a condução de outros estudos para avaliar detalhadamente o impacto desses tratamentos na eficiência reprodutiva, comparando grupos de novilhas pré-púberes que recebem ou não o tratamento de indução de ciclicidade. Ainda, existem escassas informações sobre a relevância do tratamento com estradiol na eficiência do protocolo de indução de ciclicidade.

## 4 EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE CICLICIDADE COM MANEJO ÚNICO UTILIZANDO PROGESTERONA INJETÁVEL DE LONGA AÇÃO EM NOVILHAS NELORE (*BOS INDICUS*)

### 4.1 OBJETIVO

- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento único com progesterona injetável, sem a utilização de estradiol, na indução de ciclicidade e na taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore (*Bos indicus*) pré-púberes.

### 4.2 HIPÓTESE

A retirada do tratamento com cetonato de estradiol (CE) do protocolo de indução de ciclicidade com P4 injetável não compromete a taxa de prenhez à IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*) pré-púberes.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 8942160120).

#### 4.3.1 Local e período de execução

O projeto foi executado durante o mês de Abril de 2020. O Experimento foi realizado na Fazenda Santa Vera, localizada no município de Barra do Garças-MT.

#### 4.3.2 Animais e instalações

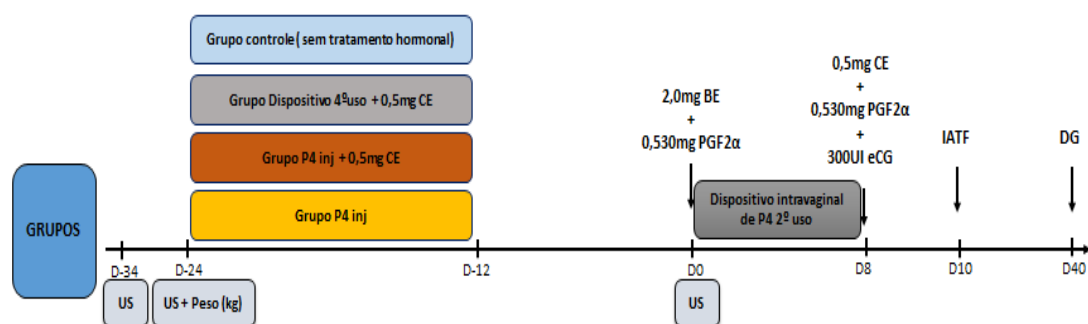
Foram utilizadas 528 novilhas Nelore (*Bos indicus*) pré-púberes. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em pastos de *brachiaria brizantha*, com acesso a água *ad libitum*. As novilhas permaneceram

neste sistema durante todo o experimento, com idas ao curral de manejo apenas para as coletas de dados e execução do experimento.

### 4.3.3 Delineamento experimental

Foram utilizadas um total de 528 novilhas da raça Nelore pré-púberes, diagnosticadas pela ausência de corpo lúteo em duas avaliações ultrassonográficas com intervalo de 7 dias (D-31 e D-24). As novilhas apresentavam 14 meses de idade, com peso vivo médio de  $303,1 \pm 30,2$  kg. Os animais foram divididos 24 dias antes do início do protocolo de IATF (D-24) em: 1) Grupo Controle (sem tratamento hormonal); 2) Grupo dispositivo de P4, no qual receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, P4), previamente utilizado por 24 dias; 3) Grupo P4 inj +CE, no qual receberam 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação (Sincrogest Injetável®) e; 4) Grupo P4 inj, no qual receberam somente 1,0ml (150mg) de P4 injetável de longa ação Injetável (Sincrogest Injetável®). Após 12 dias (D-12) e os grupos Dispositivo de P4 e P4 inj + CE receberam 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m (CE), e nenhum tratamento hormonal foi realizado nos grupos Controle e P4 inj. No primeiro dia (D0) do protocolo de sincronização os animais receberam tratamento com 2,0 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE), associado a 0,526 mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ) e a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) previamente utilizado por 8 dias. Nesse momento também foi realizada uma avaliação ultrassonográfica para verificar a ausência ou a presença de CL. Após oito dias (D8) foi feita a remoção do dispositivo intravaginal de P4 em todos os animais, associado ao tratamento com 0,526 mg i.m. de PGF2 $\alpha$ , cipionato de estradiol (CE) 0,5 mg i.m, e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) mg i.m. A IATF foi realizada 48 horas após, no D10 do protocolo.

Figura 7. Delineamento experimental: 1) Grupo Controle (Sem tratamento Hormonal); 2) Grupo Dispositivo P4 (dispositivo intravaginal de P4) previamente utilizado por 24 dias) associado ao tratamento com 0,5mg de CE 12 dias após; 3) Grupo P4 Inj + CE, 150mg (1,0mL de Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação associado ao tratamento com 0,5mg de CE 12 dias após; 4) Grupo P4 Inj, 150mg I (1,0mL de Sincrogest Injetável®) de P4 injetável de longa ação sem o tratamento com cipionato de estradiol.



#### 4.3.4 Avaliações ultrassonográficas

Todas as fêmeas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 7,5 MHz (DP10, Mindray, China) no D-34, D-24 e D0 para confirmar a situação reprodutiva dos animais (pré-púbere ou púbere) pela presença ou não de um corpo lúteo (CL), e no D40 para realizar o diagnóstico de gestação.

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Informações de cada Novilha foram compiladas em planilhas para análise estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC), através do pacote Enterprise Guide (v 7.1).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC). As variáveis avaliadas foram indução de ciclicidade e taxa de prenhez. Os dados foram analisados como distribuição binomial utilizando o procedimento Glimmix do

SAS e no modelo foi incluído os efeitos de tratamento (Grupo Dispositivo 4º uso, Grupo P4 Inj + CE, Grupo P4 Inj e Grupo controle), lote e interação lote\*tratamento. Foi utilizado como covariável o peso das novilhas. O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5% ( $P \leq 0,05$ ) e tendência quando  $P = 0,10$ .

#### 4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos gráficos 6, 7, e 8 estão apresentados os resultados que demonstram a resposta das novilhas aos tratamentos de indução de ciclicidade, a resposta conforme o peso (kg) no D-24, a taxa de prenhez à IATF por tratamento e a taxa de prenhez à IATF de acordo com a resposta à indução de ciclicidade, respectivamente.

Gráfico 6. Taxa de indução de ciclicidade no D0 do protocolo de IATF (presença de CL). Grupo Controle (sem tratamento hormonal), Grupo dispositivo de P4 previamente utilizado por 24 dias (dispositivo intravaginal de progesterona; Sincrogest®) associado ao tratamento com 0,5 mg de CE na retirada do dispositivo após 12 dias, Grupo P4 inj + CE (150mg de P4 injetável de longa ação Injetável (1,0mL de Sincrogest Injetável®) associado ao tratamento com 0,5 mg de CE após 12 dias, e Grupo P4 inj apenas com 150 mg de P4 injetável de longa ação (1mL de Sincrogest Injetável®).

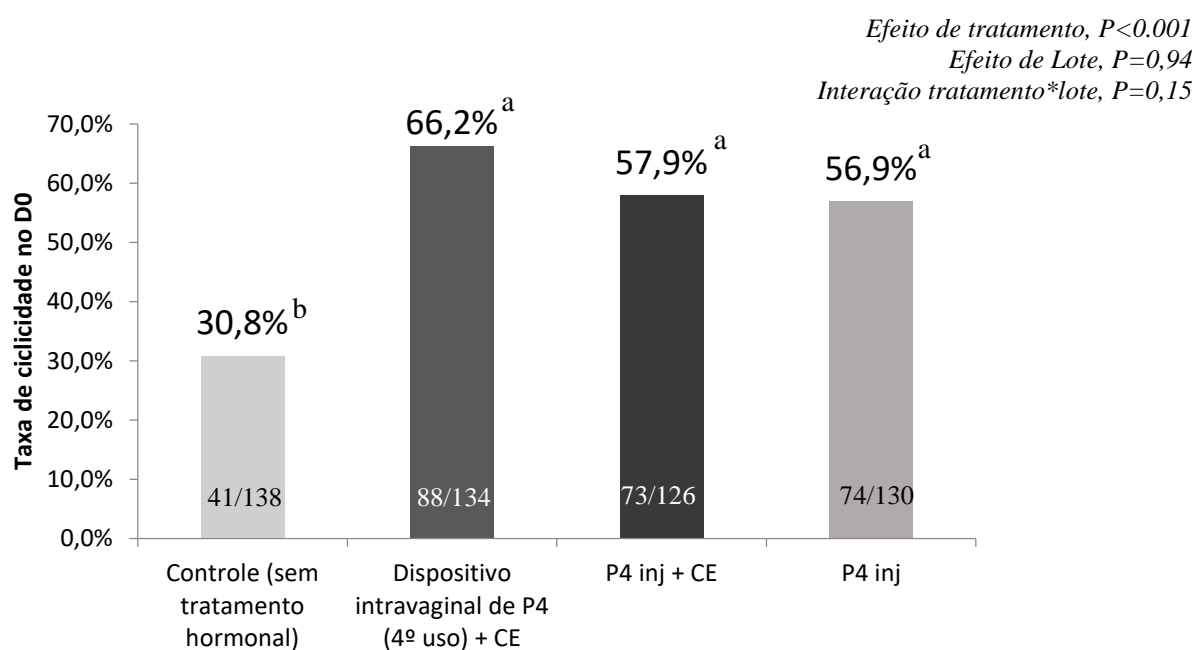


Gráfico 7. Taxa (%) de respostas aos tratamentos de indução de ciclicidade (presença de CL no D0 do protocolo de sincronização) de acordo com o peso (kg) da novilha Nelore no D-24.

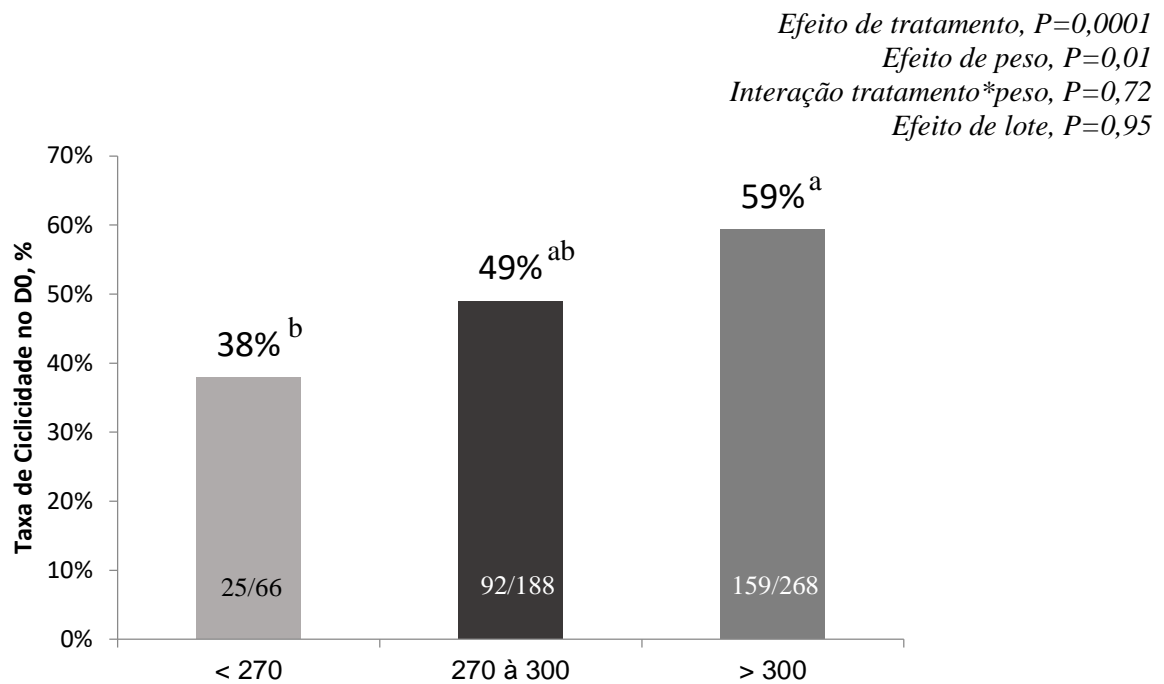
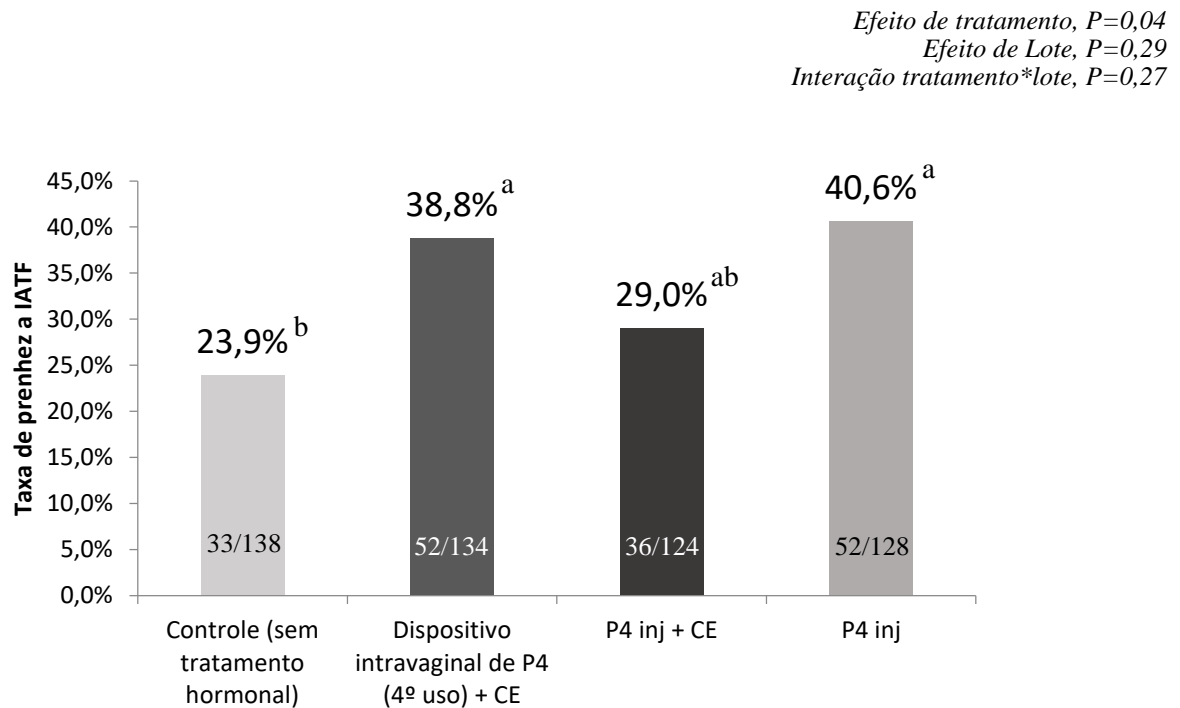


Gráfico 8. Taxa de prenhez à IATF (%) de novilhas Nelore de acordo com os grupos experimentais.





Conforme verificado no Experimento 1, os resultados desse estudo reforçam o efeito positivo do tratamento para indução de ciclicidade com P4 exógena previamente ao protocolo de IATF, na eficiência reprodutiva de novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. As novilhas que foram tratadas com protocolo para indução de ciclicidade apresentaram aumento na presença de CL no início do protocolo de sincronização, com satisfatórias taxas de prenhez à IATF, quando comparadas com as novilhas que não foram induzidas (gráficos 6 e 8). Corroborando com os dados do estudo anterior (Experimento 1), as novilhas que receberam o tratamento para indução de ciclicidade apresentaram a mesma taxa de prenhez à IATF quando apresentavam ou não um CL no início do protocolo para IATF [novilhas induzidas com CL no D0 = 35,3% (83/235) vs novilhas induzidas sem CL D0 = 33,8% (52/154);  $P = 0,75$ ]. O peso corporal das novilhas no início do protocolo de indução de ciclicidade mostrou efeito significativo na resposta à ciclicidade (presença de CL). As novilhas com peso  $\geq 300$  kg apresentaram maiores taxas de ciclicidade comparados às novilhas com peso inferior (gráfico 7). Ainda, a adição de CE ao término do protocolo de indução de ciclicidade com P4 injetável de longa ação não proporcionou incremento na resposta a ciclicidade e na taxa de prenhez à IATF (gráficos 6 e 8). Esses resultados confirmam a hipótese inicial do presente estudo.

Freitas et al. (2015) estudaram o impacto dos protocolos de indução de ciclicidade em novilhas Nelore com idade média de 14 meses. Os autores encontraram elevadas taxas de ciclicidade no grupo que recebeu o protocolo de indução de ciclicidade (75,2%), quando comparado ao grupo controle (7,8%). No presente estudo, os resultados foram de 30,8% para o grupo controle e de 56 a 66% para os grupos que receberam o protocolo de indução de ciclicidade (gráfico 6), sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). As novilhas do presente estudo apresentaram maiores taxas de ciclicidade no grupo controle quando comparadas às novilhas do estudo conduzido por Freitas et al. (2015). Essa diferença pode ser parcialmente explicada pelo peso das novilhas, que no presente estudo estava superior (303,1 vs 261,3 kg).

Freitas et al. (2015) encontraram efeito do peso ( $P = 0,03$ ) como um indicador associado a taxa de ciclicidade ao início do protocolo de IATF, corroborando com os achados desse estudo (gráfico 7). As novilhas mais pesadas apresentaram maiores taxas de resposta aos tratamentos de indução de ciclicidade. Rodrigues et al. (2013) reforçam esses achados e verificaram que novilhas pesadas tiveram maior ( $P < 0,05$ ) taxa de indução de ovulação do que novilhas leves (49,4 vs 29,1%).

A adição de CE ao término do protocolo de indução de ciclicidade com P4 injetável de longa ação não mostrou incremento na taxa de ciclicidade e na taxa de prenhez à IATF quando comparado ao grupo tratado somente com P4 injetável. Ainda, os dados apresentados no gráfico 6 evidenciam que o grupo Dispositivo intravaginal de P4 + CE quando comparado ao grupo P4 inj, não diferiram quanto a presença de CL no início do protocolo de sincronização para IATF (66,2 vs 56,9%) e na taxa de prenhez à IATF (38,8 vs 40,6%; gráfico 8). Sales et al. (2008), quando analisaram um estudo com 226 novilhas cruzadas, também não encontraram diferença na taxa de resposta à indução de ciclicidade no grupo tratado com P4 (44,0%) comparado com o grupo tratado com P4+CE (48,0%). Entretanto, ambos os grupos que receberam o tratamento para indução de ciclicidade foram superiores ao grupo controle (18,7%, sem indução). Rodrigues et al. (2013) mostraram que o grupo controle (CIDR 4º uso) não diferiu na taxa de resposta a ciclicidade quando comparado ao grupo tratado com CIDR 4º + CE ao término do protocolo de indução (74,9 vs 80,4%, respectivamente). Sá Filho et al. (2015) numa sequência de estudos realizados com novilhas Nelore pré-puberes, verificaram que a taxa de ciclicidade foi inferior no grupo que só recebeu o dispositivo de P4 por 10 dias (58,5%), quando comparado ao grupo que recebeu dispositivo de P4 por 10 dias associado ao tratamento com 0,5mg de CE na retirada do dispositivo (67,2%). Entretanto, os efeitos positivos do tratamento com CE não foram observados na taxa de prenhez à IATF (29,2 vs 36,7%).

Rodrigues et al. (2013), sugerem que novilhas mais pesadas podem estar próximas à puberdade e, provavelmente, um menor estímulo é necessário para induzir ovulação. Essa especulação é suportada pelos resultados dos autores que verificaram que a taxa de ovulação foi de 75% nas novilhas tratadas somente com o CIDR. Em outro experimento realizado pelos

mesmos autores a taxa de ovulação induzida com o mesmo tratamento foi de apenas 45%. Os autores relatam que as novilhas desse experimento estavam mais leves.

Felisbino et al. (2021; dados não publicados) estudaram 373 novilhas Nelore entre 14 e 24 meses, com duas avaliações por US com intervalos de 10 dias antes de entrarem na EM. Os autores utilizaram somente novilhas sem CL no experimento. Foram formados três grupos para avaliar a resposta ao protocolo de indução de ciclicidade e a taxa de prenhez à IATF. Além disso, foi realizada a dinâmica folicular e a avaliação do diâmetro uterino no D0 (início do protocolo de sincronização para IATF). O Grupo controle (sem indução) não recebeu nenhum tratamento e permaneceu juntamente com os grupos tratados até o início do protocolo para a IATF. O Grupo que recebeu a indução no D-24 foi tratado com 150mg de P4 injetável (1,0ml; Sincrogest injetável) e 0,5mg IM de CE após 12 dias (D-12). O Grupo indução D-10 receberam 150mg de P4 injetável (1,0ml; Sincrogest injetável) 10 dias antes do início do protocolo de IATF.

Os resultados foram indicativos de que as novilhas do grupo D-10 tiveram maior diâmetro uterino quando comparadas com as novilhas do grupo D-24 ( $15,4 \pm 0,32\text{mm}^a$  vs  $14,6 \pm 0,34\text{mm}^b$ ), sendo ambos superiores ao grupo controle ( $13,6 \pm 0,34\text{mm}^c$ ). O diâmetro do maior folículo no início do protocolo de sincronização também foi superior para o grupo D-10 ( $11,2 \pm 0,47\text{mm}^a$ ), seguido pelo grupo controle ( $9,3 \pm 0,36\text{mm}^b$ ). O menor diâmetro foi verificado no grupo D-24 ( $6,5 \pm 0,51\text{mm}^c$ ). A presença de CL no D0 do protocolo de sincronização para IATF foi de 45% para o grupo D-24 e ausente para os grupos D-10 e controle. Esses dados foram analisados no D0, ou seja, o grupo D-24 estava com 12 dias do tratamento com CE para indução da ovulação, o que aumentou a presença de CL e possivelmente as concentrações circulantes de P4. Elevadas concentrações de P4 reduzem a pulsatilidade de LH e podem comprometer o crescimento do folículo dominante (ROBERSON et al., 1989). Como o grupo D-10 estava em queda nas concentrações circulantes desse hormônio, justificando em parte os achados desse estudo.

Motta et al. (2020) demonstraram que o aumento da área endometrial ocorre apenas sob associação de alto E2 e baixa P4, o que pode justificar os

resultados encontrados no grupo D-10, que apresentaram maior diâmetro uterino associado ao maior diâmetro do folículo dominante.

A taxa de prenhez à IATF foi superior nas novilhas do grupo D-10 (50.6%<sup>a</sup>; 43/85), mesmo com 0% de taxa de ciclicidade no D0. As novilhas do grupo D-24 (35.8<sup>b</sup>; 39/109) e controle (31.7<sup>b</sup>; 26/82) apresentaram menores taxas de prenhez à IATF. Esses achados do estudo de Felisbino et al. (2021, dados não publicados) sugerem que as novilhas do grupo D-10 apresentarem maior diâmetro uterino e folicular e pode ser uma alternativa de protocolo de para melhorar a resposta de novilhas Nelore pré-púbers ao protocolo de sincronização para IATF. Entretanto, futuros estudos são necessários para avaliar repetibilidade dessas informações.

## **5 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA DOSE DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA NA TAXA DE PRENHEZ AOS 30 E 60 DIAS EM NOVILHAS NELORE (*BOS INDICUS*)**

### **5.1 OBJETIVO**

- ✓ Estudar o efeito de diferentes doses (0 vs 200 vs 300 UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da remoção do dispositivo de P4 em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF.

### **5.2 HIPÓTESE**

A redução da dose de gonadotrofina coriônica equina (eCG; de 300UI para 200UI) não interfere na taxa de prenhez à IATF. Entretanto, novilhas tratadas com eCG (tanto na dose de 200UI quanto de 300UI) apresentam aumento na resposta ao protocolo de sincronização da ovulação para IATF quando comparadas às novilhas não tratadas. O tratamento com eCG (200 e 300UI) aumenta o diâmetro folicular no momento da IATF, a taxa de ovulação (sem induzir duplas ovulações), o diâmetro do CL no diestro subsequente à sincronização e a taxa de prenhez à IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

### **5.3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 5796310818).

#### **5.3.1 Local e período de execução**

O projeto foi executado durante o período de Dezembro de 2018 a Novembro de 2020. O Experimento foi realizado na Fazenda Santa Vera, localizada no município de Barra do Garças-MT.

### 5.3.2 Animais e instalações

Foram utilizadas 398 novilhas Nelore púberes e pré-púberes. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em pastagem de *brachiaria brizantha*, com acesso a água *ad libitum*. As novilhas permaneceram neste sistema durante todo o experimento, com idas ao curral somente para coletas de dados e execução do experimento.

### 5.3.3 Delineamento experimental

Utilizou-se um total de 398 novilhas, diagnosticadas pela ausência ou presença de corpo lúteo em uma avaliação ultrassonográfica no início do protocolo de IATF (D0). As novilhas foram submetidas a protocolo (D-24) de indução de ciclicidade de 12 dias com dispositivo intravaginal de progesterona (P4; previamente utilizado por 24 dias), com adição de 0,5 mg cipionato de estradiol i.m (CE) na remoção (D-12). No primeiro dia (D0) do protocolo de sincronização da ovulação para IATF, os animais receberam tratamento com 2,0 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE), associado a 0,526 mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ), inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) previamente utilizado por 8 dias e uma avaliação ultrassonográfica (US) para diagnosticar a ausência ou a presença de CL. Após oito dias (D8) foi realizada a remoção do dispositivo de P4 em todos os animais receberam tratamento com 0,526 mg i.m. de PGF2 $\alpha$  e 0,5 mg i. m de cipionato de estradiol (CE). Neste momento os animais foram randomizados em 3 grupos distintos de acordo com os seguintes tratamentos: Grupo 1) sem tratamento, (0UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG). Grupo 2) os animais receberam 200UI de eCG e Grupo 3) os animais receberam 300UI de eCG. A IATF foi realizada em todos os grupos 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 (D10 do protocolo), juntamente com um exame de US para mensuração do diâmetro folicular. Após 10 dias da IATF foi realizado outro exame ultrassonográfico para avaliar a presença e o mensurar o diâmetro do CL.

Figura 8. Delineamento experimental: Grupo 1) as novilhas sem tratamento 0UI de eCG i. m. Grupo 2) as novilhas receberam 200UI de eCG i. m. e Grupo 3) as novilhas receberam 300UI de eCG i. m.

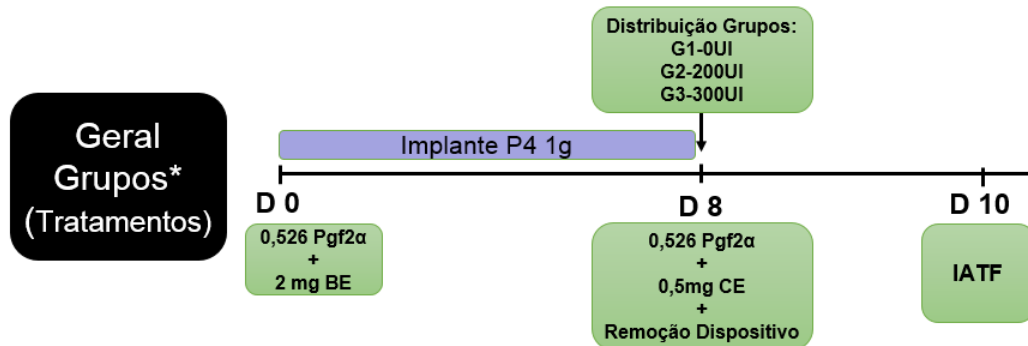
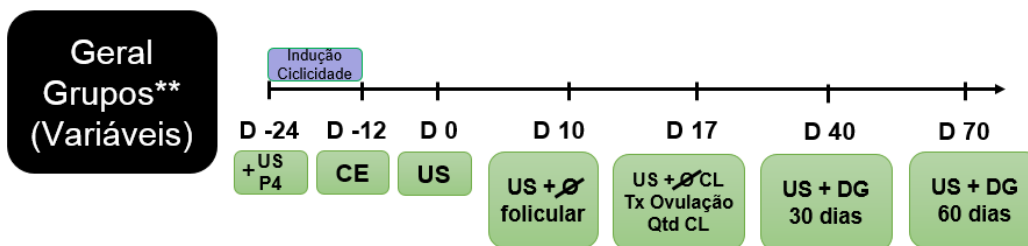


Figura 9. Delineamento experimental: protocolo de indução de ciclicidade e de sincronização para IATF de novilhas Nelore. As análises e tratamentos foram realizadas em todos os Grupos experimentais citados na figura 8 (protocolo de indução à ciclicidade, avaliações ultrassonográficas e diagnóstico de gestação).

US: Avaliação ultrassonográfica; DG: Diagnóstico de gestação.



### 5.3.4 Avaliações ultrassonográficas

Todas as fêmeas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 7,5 MHz (DP10, Mindray, China) no D-24 e no D0 para diagnóstico da presença ou não de um corpo lúteo (CL). Outras avaliações ultrassonográficas foram realizadas no D10, D17 para aferir o diâmetro folicular e também no D40 e D70 para realizar o diagnóstico de gestação.

## 5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows (SAS, 2001). As variáveis contínuas analisadas foram diâmetro folicular na IATF e diâmetro do corpo lúteo no D20 e as variáveis binomiais analisadas foram taxa de ovulação no D20, taxa de ciclicidade no D40, taxas de prenhez aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação. Os dados contínuos foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE (transformado quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. Contrastes ortogonais foram criados para avaliar o efeito de eCG (C1 – Controle vs doses de eCG) e efeito da dose de eCG (C2 – 200UI vs 300UI de eCG).

O procedimento GLIMMIX do SAS foi utilizado para análise dos dados e o teste de Tukey para determinar diferença entre os grupos experimentais. Na análise de dados binomiais (taxas de ovulação, prenhez aos 30 e 60 dias e perda gestacional), as variáveis inicialmente incluídas no modelo foram tratamento (0UI, 200UI e 300UI), ciclicidade no D0, fazenda, inseminador, touro e período de IA (AM e PM) e interações.

Os dados foram analisados por regressão logística multivariada usando o procedimento LOGISTIC. As variáveis foram removidas por eliminação retrógrada, com base no critério estatístico de Wald quando  $P > 0,20$ . As variáveis incluídas no modelo final para analisar a taxa de ovulação foram: tratamento, ciclicidade no D0, touro, período de IA e interações e as variáveis incluídas no modelo final para analisar a taxa de prenhez aos 30 e 60 dias e perda gestacional foram: tratamento, ciclicidade no D0 e interação. Os mesmos contrastes ortogonais foram utilizados para a análise de dados binomiais. Diferenças significantes foram indicadas por uma probabilidade de  $P < 0,05$ . As variáveis contínuas foram expressas em média  $\pm$  EPM e as binomiais em porcentagem.

## 5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de sincronização da ovulação para IATF apresentou resposta satisfatória, com 87,9% (350/398) de taxa de ovulação. No início do protocolo (D0), a presença de CL foi similar entre os grupos experimentais [G-



0UI = 65.2% (92/141) VS. G-200UI = 55.3% (73/132) VS. 63.2% (79/125); P= 0.16]. Nenhuma interação entre a presença de CL no D0 e os tratamentos com eCG foram encontradas para quaisquer variáveis explanatórias (P > 0.05).

O diâmetro do maior folículo no momento da IATF (D10) não foi influenciado pelo tratamento com eCG (P = 0.22) e nem pela dose de eCG (P = 0.18). Contudo, o tratamento com eCG aumentou a taxa de ovulação (P = 0.002) e o diâmetro do CL no D17 (P = 0.001), independente da dose utilizada. Nem o efeito de eCG e nem da dose de eCG foram observados para o número de CL no D17, ovulações duplas e taxa de gestações gemelares. Dados estão presentes na tabela 3.

Tabela 3. Efeito da dose de eCG (0, 200 and 300UI) no momento da remoção do dispositivo intravaginal de P4 (D8) na resposta folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de IATF.

	G-0 UI	G-200 UI	G-300UI	C1 (efeito eCG)	C2 (efeito dose)
Presença de CL no D0 (%)	65.3 (92/141)	55.3 (73/132)	63.2 (79/125)	0.27	0.13
ECC no D0	2.83 ± 0.02	2.82 ± 0.01	2.81 ± 0.02	0.49	0.62
Ø FD no D10, IATF (mm)	11.0±0.2	10.4±0.2	10.8±0.3	0.22	0.18
Taxa de ovulação (%)	79.4 <sup>b</sup> (112/141)	90.2 <sup>a</sup> (119/132)	93.6 <sup>a</sup> (117/125)	0.002	0.36
Ø CL no D17 (mm)	15.7±0.3 <sup>b</sup>	16.6±0.2 <sup>a</sup>	16.6±0.3 <sup>a</sup>	0.001	0.94
Número de CL no D17	0.81±0.04	0.91±0.03	0.96±0.02	0.86	0.45
Ovulação Dupla (%)	1.8 (2/112)	0.8 (1/119)	1.7 (2/117)	0.54	0.55
Taxa de gêmeos (%)	0 (0/141)	0 (0/132)	0 (0/125)	0.99	0.99

FD – Maior Folículo.

Contraste ortogonal: C1 (efeito de eCG): Controle x (200UI + 300UI); C2 (efeito da dose de eCG dose): 200UI x 300UI.

As taxas de prenhez à IATF no D40 ( $P=0.05$ ) e no D70 ( $P=0.02$ ) foram superiores para as novilhas tratadas com eCG, contudo não foi encontrado efeito de dose de eCG na taxa de prenhez no D40 ( $P=0.89$ ) e no D70 ( $P=0.98$ ). A perda gestacional entre o D40 e o D70 foi inferior ( $P=0.07$ ) nas novilhas tratadas com eCG. Entretanto, não se verificou efeito da dose de eCG para essa variável ( $P=0.91$ ). Nem efeito de eCG, nem efeito de dose de eCG foram observados para a presença de Cl nas novilhas diagnosticadas não gestantes no D40. Os dados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Efeito da dose de eCG (0, 200 e 300UI) no momento da remoção do dispositivo intravaginal de P4 (D8) nas taxas de ovulação, de prenhez e de perda gestacional em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de IATF.

	<b>G-0 UI</b>	<b>G-200 UI</b>	<b>G-300UI</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
Prenhez IATF somente nas ovuladas (%)	40.2 (45/112)	47.1 (56/119)	45.3 (53/117)	0.28	0.79
Prenhez no D40 (%)	32.6 <sup>b</sup> (46/141)	42.4 <sup>a</sup> (56/132)	42.4 <sup>a</sup> (53/125)	0.05	0.89
Prenhez no D70 (%)	29.1 <sup>b</sup> (41/141)	40.9 <sup>a</sup> (54/132)	40.8 <sup>a</sup> (51/125)	0.02	0.98
Presença de CL nas vazias no D40 (%)	68.4 (65/95)	69.7 (53/76)	70.8 (51/72)	0.74	0.81
Perda gestacional entre o D40 e o D70 (%)	10.9 (5/46)	3.6 (2/56)	3.8 (2/53)	0.07	0.91

Contraste ortogonal: C1 (efeito de eCG): controle x (200UI + 300UI); C2 (efeito da dose de eCG): 200UI x 300UI.

O presente estudo reforça a importância do tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona em protocolos de IATF em novilhas Nelore. Inclusive, os efeitos positivos do tratamento foram evidenciados mesmo com a dose reduzida de eCG. As novilhas tratadas com eCG apresentaram aumento do diâmetro do maior folículo no momento da IATF, na taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização, no diâmetro do CL 7 dias após a IATF e na P/AI. Inclusive, as novilhas tratadas com eCG também apresentaram redução da perda gestacional. Todos esses efeitos positivos foram verificados independentemente da dose de eCG utilizada,

indicando que a dose de 200UI de eCG pode ser recomendada para novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. Esses resultados confirmam a hipótese inicial do presente estudo.

A ação farmacológica do tratamento com eCG está diretamente ligada à estimulação tanto do crescimento folicular quanto da função do CL (BARUSELLI et al., 2004a,b; MENEGHETTI et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Estudos evidenciaram correlação positiva entre o tamanho do folículo pré-ovulatório e a probabilidade de ovulação e a taxa de prenhez, tanto em vacas no período pós-parto (SÁ FILHO et al., 2008a) quanto em novilhas (SÁ FILHO et al., 2008b; DIAS et al., 2009) *Bos indicus*. Em fêmeas *Bos taurus*, verificou-se que um folículo ovulatório de maior diâmetro apresenta um oócito de melhor qualidade, que está relacionado a maior fertilidade (MUSSARD et al., 2007; PERRY et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2001). No presente estudo, o tratamento com eCG não aumentou o diâmetro do folículo no momento da IATF.

Alguns autores relatam a relação positiva entre as concentrações circulantes de progesterona durante a fase inicial da gestação e a fertilidade (BINELLI et al., 2001; BÓ et al., 2002; THATCHER et al., 2001). O tratamento com eCG aumenta a concentração de progesterona no ciclo estral subsequente a aplicação de eCG (BARUSELLI et al., 2000; FUENTES e DE LA FUENTE, 1997). Esse efeito positivo pode ser devido a natureza luteotrófica da eCG (MARQUES et al., 2003 e BARUSELLI et al., 2004a). O impacto positivo da eCG no resultado de prenhez pode estar associado com a habilidade da eCG de induzir mudanças moleculares, celulares e tecidual que estão relacionadas ao aumento da capacidade funcional da produção de P4 (FÁTIMA et al., 2012a).

Na literatura existem estudos que demonstram que o tratamento com eCG estimulou a expressão de proteínas esteroidogênicas como STAR, bem como a regulação da biossíntese de colesterol e genes relacionados à estrutura das organelas relacionadas a produção de progesterona. A expressão diferencial desses genes é proposta como uma causa importante que leva ao aumento do volume do CL e melhora na produção de progesterona pelas células luteínicas (FÁTIMA et al., 2012b).

Nesse estudo, o tratamento com eCG aumentou o diâmetro do CL após a IATF e pode ter aumentado a concentração circulante de P4 no início do diestro, o que pode explicar o aumento da P/AI. Esses estudos corroboram com trabalhos publicados anteriormente que evidenciaram efeito do tratamento com eCG na taxa de ovulação e na concentração plasmática de P4 no diestro subsequente à IATF. Novilhas Nelore tratadas com eCG apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) taxa de ovulação [76% (16/21) vs. 50% (10/20)], concentração plasmática de P4 somente nas novilhas ovuladas ( $4,31 \pm 0,56$  vs.  $2,22 \pm 0,16$  ng / ml) e concentração plasmática de P4 em todas as novilhas tratadas ( $3,46 \pm 0,62$  vs.  $1,30 \pm 0,25$  ng / ml) quando comparadas com novilhas do grupo controle (sem tratamento com eCG no momento da remoção do dispositivo de P4; BARUSELLI et al., 2004b).

Outro estudo foi realizado em novilhas Nelore tratadas ou não com eCG (SÁ FILHO et al., 2009). Os autores também verificaram diferenças ( $P < 0,05$ ) na resposta ao protocolo de sincronização entre novilhas que receberam as doses de 0UI ou 400UI de eCG. Foram verificados efeitos positivos do tratamento com eCG na taxa de crescimento diária do folículo dominante entre a retirada da fonte de P4 e a IATF (0UI =  $0,6 \pm 0,1$  mm vs. 400UI =  $1,1 \pm 0,1$  mm), a taxa de ovulação (0UI = 73,6% vs 400UI = 94,4%) e a taxa de prenhez (0UI = 36,8% vs 400UI = 50,0%). Resultados semelhantes foram encontrados por Peres et al. (2009) que verificaram que o tratamento com eCG (0UI vs 200UI vs 300UI) aumentou ( $P < 0,05$ ) o diâmetro do folículo dominante na IATF ( $11,50 \pm 0,10$  mm,  $11,90 \pm 0,11$  mm e  $12,00 \pm 0,10$  mm para 0, 200 e 300 UI, respectivamente), a concentração de progesterona sérica no Dia 18 ( $2,77 \pm 0,11$  ng / mL,  $3,81 \pm 0,11$  ng / mL e  $4,87 \pm 0,11$  ng / mL) e as taxas de ovulação (83,8%, 88,5% e 94,3%) e de prenhez (41,3%, 47,0% e 46,7%).

Os resultados do presente estudo suportam estudos publicados na literatura e reforçam a importância do tratamento com eCG na retirada do dispositivo de P4 para melhorar a resposta ao protocolo de sincronização da ovulação para IATF em novilhas Nelore. Ainda, corroboram com a possibilidade de redução da dose de eCG para 200UI, sem comprometer a eficiência do protocolo de sincronização.

Novilhas com a presença de CL no D0 do protocolo de sincronização apresentam aumento no diâmetro do maior folículo no D10 ( $P = 0,05$ ), no

diâmetro do CL no D17 ( $P = 0.01$ ) e na taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização para IATF ( $P = 0.01$ ). Além disso, as novilhas com CL no D0, quando diagnosticadas como vazias no D40, apresentaram maior quantidade de CL quando comparadas com a novilhas sem CL no D0. Contudo, não houve diferenças na prenhez à IATF no D40 ( $P=0.52$ ) ou D70 ( $P=0.84$ ) em novilhas com presença ou ausência de CL no D0. Os dados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Efeito da presença de CL no D0 sobre o diâmetro do maior folículo no D10, diâmetro do CL no diestro subsequente (D17), taxa de ovulação, taxa de prenhez no D40 e D70 e perdas gestacionais em novilhas Nelore submetidas ao protocolo de IATF.

	Presença CL no D0	Ausência CL no D0	Valor P	
			CL no D0	CL*eCG
Número de animais	244	154	-	-
ECC (escala de 1 à 5)	2.87±0.02	2.75±0.03	-	-
Diâmetro FD no D10 (mm)	11.2±0.2	10.2±0.2	0.05	0.06
Diâmetro CL no D17 (mm)	15.8±0.03	11.8±0.6	0.01	0.56
Taxa de ovulação (%)	95.5 (233/244)	74.7 (115/154)	0.01	0.12
Prenhez D40 (%)	39.8 (97/244)	37.7 (58/154)	0.52	0.16
Presença de CL nas vazias no 40 (%)	87.1 (128/147)	42.7 (41/96)	0.01	0.97
Prenhez D70 (%)	36.5 (89/244)	37.0 (57/154)	0.84	0.15
Perda gestacional (D40 para D70; %)	3.3 (8/97)	0.6 (1/58)	0.18	0.99

Estudos anteriores discutiram o efeito da ciclicidade das novilhas no início da estação reprodutiva sobre a fertilidade (SÁ FILHO et al., 2010). No presente estudo, aumento nas respostas ovulatórias e na taxa de prenhez à IATF foram observadas em novilhas com CL no dia 0 (novilhas que atingiram a puberdade). Novilhas pré-púberes apresentam menor desenvolvimento uterino às novilhas que atingiram a puberdade, sugerindo uma importante relação entre útero as gonadas (DESJARDINS; HAFS, 1969; .HONARAMOOZ et al., 2004)

O início da produção de esteróides ovarianos (estrógeno e progesterona) em novilhas que atingem a puberdade colabora com o desenvolvimento do sistema genital e melhora o ambiente uterino para o estabelecimento e a manutenção da gestação (FREITAS, 2015). As alterações fisiológicas associadas à puberdade e ao início da atividade cíclica podem estar associadas ao desenvolvimento do hipotálamo, hipófise e útero, melhorando a fertilidade das novilhas Nelore submetidas à IATF.

As novilhas com presença de CL no D0, quando diagnosticadas como vazias no D40, apresentaram maior taxa de CL que as novilhas sem a presença de CL no D0 do protocolo de sincronização (87,1% vs 42.7%).

## **6 EXPERIMENTO 4 – EFEITO DA DURAÇÃO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF EM NOVILHAS NELORE (*BOS INDICUS*).**

### **6.1 OBJETIVO**

- ✓ Comparar a eficiência do protocolo a base de E2/P4 com duração de 7 (P4-7d) ou 8 (P4-8d) dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4 em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

### **6.2 HIPÓTESE**

Novilhas Nelore (púberes e pré-púberes), que passaram por uma prévia sincronização (indução de ciclicidade) antes da IATF, quando submetidas a um protocolo de IATF com 7 dias de permanência do dispositivo de P4, apresentarão maior taxa de prenhez na IATF, em relação à com 8 dias.

### **6.3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 7206110320).

#### **6.3.1 Local e período de execução**

O projeto foi executado durante o período de Julho de 2020 a outubro de 2020. O Experimento foi realizado nas Fazendas, Santa Vera, Santa Cruz da Serra e Jacarandá, localizadas nos municípios de Barra do Garças - MT e Araguaiana - MT, respectivamente. Foram avaliadas 1.211 Novilhas Nelore (pré-púberes).

### 6.3.2 Animais e instalações

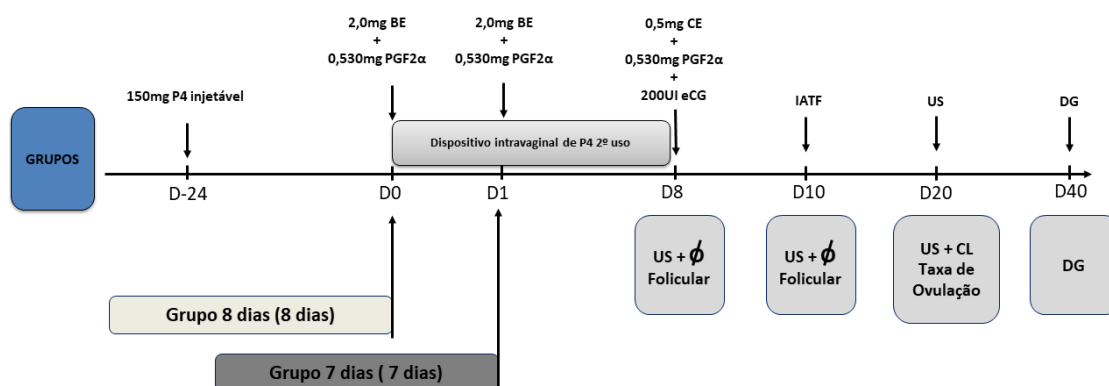
Durante todo o experimento os animais foram mantidos nos pastos da propriedade, com acesso a água *ad libitum*, *brachiaria brizantha* e manejo nutricional estabelecido na propriedade. Permaneceram neste sistema durante todo o experimento, com somente idas ao curral como manejo de rotina, para as coletas de dados e execução do trabalho.

### 6.3.3 Delineamento experimental

Foram utilizadas 1.211 novilhas Nelore *Bos indicus*, com idade de 24 meses e escore de condição corporal (ECC) de  $3,16 \pm 0,35$ , em cinco fazendas (três fazendas com suplementação protéico/energética e duas fazendas sem suplementação) localizadas em Mato Grosso. Em todas as fazendas, as novilhas foram pré-sincronizadas 24 dias antes do início do protocolo (D0) com 150mg de P4 injetável (Sincrogest injetável®, Ourofino, Brasil). No D0, o grupo P48d (n=618) recebeu 2mg de BE (Sincrodiol®, Ourofino), 530µg de cloprostenol sódico (PGF2α; Sincrocio®, Ourofino, Brasil) um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ourofino, Brasil) de 3º uso. Na remoção do dispositivo (D8), administrou-se 0,5 mg de cipionato de estradiol (SincroCp®, Ourofino, Brasil), 200 UI de eCG (SincroeCG®, Ourofino, Brasil) e 530µg PGF2α (Sincrocio®, Ourofino, Brasil). A IATF foi realizada 48h após (D10). No grupo P47d (n=593), utilizou-se o mesmo protocolo, diferenciando somente o dia de início da sincronização (D1). A taxa de prenhez foi avaliada por ultrassonografia 30 dias após a IATF.



Figura 10. Representação esquemática do delineamento experimental realizado: nos grupos com 8 e 7 dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4.



### 6.3.4 Avaliações ultrassonográficas

Todas as fêmeas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 7,5 MHz (DP10, Mindray, China) no D0 para diagnosticar a presença ou não de um corpo lúteo (CL). Outras avaliações foram realizadas no D8 e D10 para aferir o diâmetro folicular, no D20 para avaliar a taxa de ovulação pela presença do CL e no D40 para o diagnóstico de gestação.

### 6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Informações de cada Novilha foram compiladas em planilhas para análise estatística. Análises estatísticas foram performadas usando Statistical Analysis System for Windows (SAS, 2001). As variáveis contínuas avaliadas foram diâmetro folicular na remoção do dispositivo e na IATF e diâmetro do corpo lúteo no D20. As variáveis binomiais avaliadas foram taxa de ovulação no D20, taxas de prenhez aos 30 dias de gestação. Os dados contínuos foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE (transformado quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para determinar diferença entre os grupos experimentais. Todos os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM.

Taxa de ovulação foi usado o procedimento GLIMMIX para distribuições binomiais e resultados expressos em porcentagem (%). Para as taxas de prenhez aos 30 as variáveis inicialmente incluídas no modelo foram tratamento (7 x 8 dias), ECC e fazendas. Dados foram analisados por regressão logística usando o procedimento LOGISTIC. Variáveis foram removidas pelo BACKWARD elimination, baseado no critério estatístico de wald, quando  $P > 0,20$ . Os dados binomiais foram expressos por porcentagem.

O nível de significância utilizado para rejeitar  $H_0$  (hipótese de nulidade) foi de 5% ( $P \leq 0,05$ ) e tendência quando  $P < 0,10$ .

## 6.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado no gráfico 9, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais na taxa de prenhez à IATF [P47d = 56,2% (333/593) VS. P48d = 51,3% (317/618);  $P=0,67$ ]. No entanto, houve interação ( $P=0,05$ ) entre o tempo de permanência do dispositivo de P4 e entre fazendas na taxa de prenhez à IATF.

No gráfico 10, verificou-se que a taxa de prenhez aumentou no grupo P47d somente nas fazendas que realizam a suplementação nutricional [P47d = 59,2% (261/441)<sup>a</sup> vs P48d = 51,0% (225/441)<sup>b</sup>;  $P=0,01$ ]. Entretanto, nas fazendas que não realizam suplementação protéico/energética não houve diferença na taxa de prenhez à IATF entre os tratamentos de sincronização [P47d = 47,4% (72/152) vs P48d = 52,0% (92/177);  $P=0,41$ ].

Gráfico 9. Taxa de prenhez à IATF entre os grupos de novilhas Nelore sincronizadas com 7 vs 8 dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4.

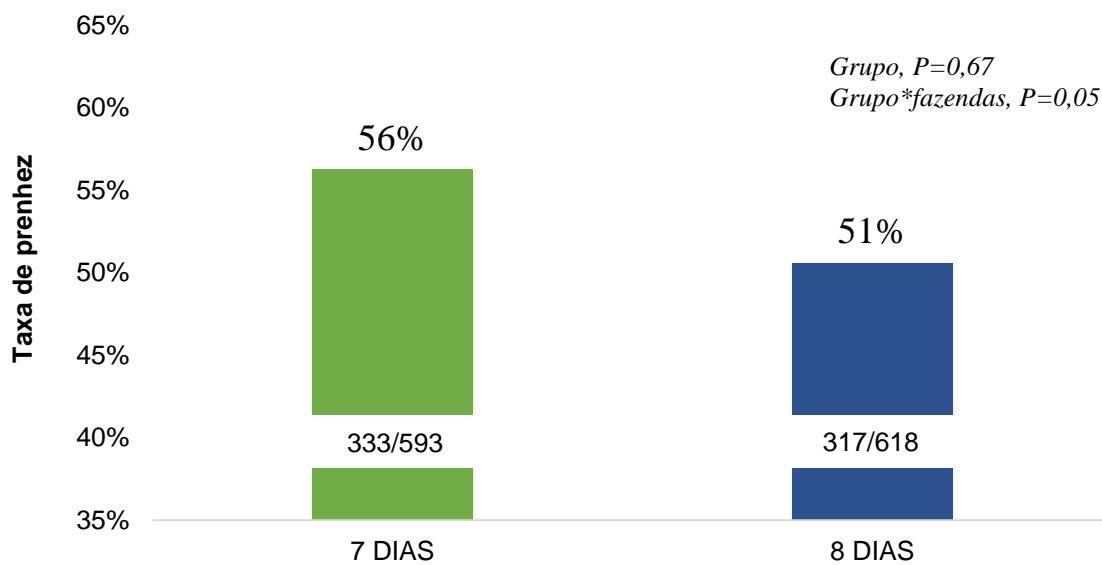
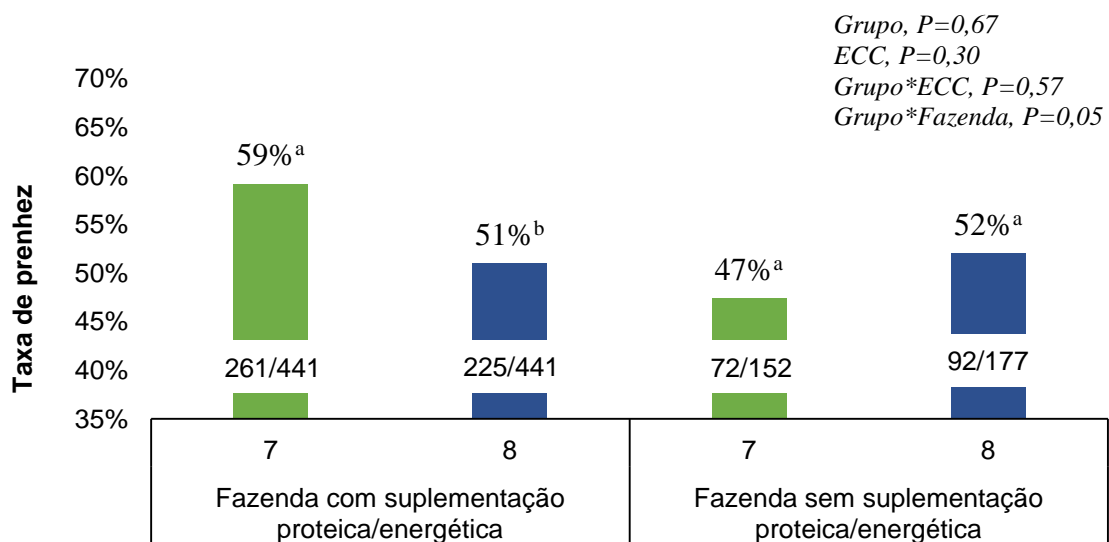


Gráfico 10. Taxa de prenhez à IATF entre os grupos de novilhas Nelore sincronizadas com 7 vs 8 dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4, estratificados por fazendas que utilizam ou não suplementação nutricional.



No presente estudo, o tempo de permanência do dispositivo intravaginal de P4 não influenciou a taxa de prenhez [P4-7d = 56,2% (333/593) VS. P4-8d =

51,3% (317/618);  $P=0,67$ ]. Entretanto, verificou-se interação tratamento e fazenda na taxa de prenhez à IATF das novilhas Nelore. Inúmeros fatores relacionados ao manejo da fazenda podem comprometer a resposta aos protocolos de IATF (FRIGONI, 2020). Nesse estudo foi verificado que, nas fazendas que realizavam a suplementação proteico/energético das novilhas, o protocolo com 7 dias de duração do dispositivo de P4 apresentou maior taxa de prenhez à IATF quando comparado ao protocolo de 8 dias de duração [P4-7d = 59,2% (261/441)<sup>a</sup> vs P4-8d = 51,0% (225/441)<sup>b</sup>]. Entretanto, esse efeito não foi verificado nas fazendas que não realizavam a suplementação das novilhas [P4-7d = 47,4% (72/152) vs P4-8d = 52,0% (92/177);  $P=0,41$ ].

O protocolo de sincronização para IATF em novilhas emprega o tratamento com prostaglandina no D0 com o objetivo de induzir a lise do CL presente e reduzir as concentrações circulantes de P4 durante o crescimento do folículo dominante, melhorando as taxas de crescimento e de ovulação do folículo dominante e a fertilidade das novilhas sincronizadas (CARVALHO et al., 2008). Recentemente, foi verificado que novilhas Nelore submetidas a alto consumo de matéria seca/energia apresentam ativação da via hepática de metabolização da P4, reduzindo as concentrações circulantes de P4 durante o protocolo e aumentando o crescimento do folículo dominante e a taxa de ovulação (BATISTA et al., 2020). Essas evidências colaboram para compreender a resposta aos protocolos de IATF em novilhas Nelore e podem justificar variações na resposta à sincronização conforme a nutrição das novilhas e os tratamentos realizados.

Felisbino et al. (2019) evidenciaram elevada a taxa de ovulação antecipada (30,3% das novilhas ovularam entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF) em 301 novilhas Nelore sincronizadas com protocolos com 8 dias de permanência do dispositivo de P4. As novilhas que ovularam antecipadamente apresentaram maior diâmetro do FD no momento da remoção do dispositivo de P4 (11,14 vs 9,58mm, respectivamente) e inferiores taxa de prenhez à IATF (22,9% vs 42,9%). Dados de Gimenes et al. (2008) mostram que os folículos de novilhas Nelore atingem capacidade ovulatória com diâmetro médio de 7,6mm. Contudo, as respostas aumentam quando o FD atinge 8,5mm de diâmetro, podendo justificar a elevada taxa de ovulação observada antes da IATF das

novilhas que apresentarm maior diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4.

Barbuio et al. (2020) verificaram redução na taxa de ovulação antecipada em novilhas Nelore sincronizadas com protocolos de 7 quando comparadas com novilhas sincronizadas com protocolos de 8 dias de permanência do dispositivo de P4. Os autores encontraram maior taxa de ovulação antecipada em novilhas sincronizadas com 8 dias (16,7%) quando comparadas com novilhas sincronizadas com 7 dias (4,7%) de permanência do dispositivo de P4. Esses dados suportam a possibilidade de melhorar a taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore sincronizadas com protocolos de 7 dias de permanência do dispositivo de P4 e que empregam o tratamento com prostaglandina no início do protocolo.

O momento ideal em que a inseminação deve ocorrer em relação à ovulação depende principalmente da expectativa de vida dos espermatozoides e da viabilidade do oócito no trato genital feminino (HUNTER, 1994). Dransfield et al. (1998) e Roelofs et al. (2005) demonstraram que a probabilidade de ocorrer a concepção diminui quando a IA é realizada próximo ao momento da ovulação (menos de 12 ou 6 horas antes da ovulação, respectivamente). Esses achados podem explicar a menor taxa de prenhez nas novilhas que apresentam ovulação antecipada (antes da IATF), obtida com maior frequência nos protocolos de maior duração.

Barbuio et al. (2020), quando compararam a taxa de prenhez em novilhas Nelore de aproximadamente 27 meses de idade, também não encontraram diferença na taxa de prenhez à IATF conforme o tempo de permanência do dispositivo de P4 [8 dias de P4= 44.3% (179/404) vs. 7 dias de P4= 47.3% (179/376); P=0.20]. Entretanto, as novilhas do grupo de 8 dias apresentaram maior diâmetro do folículo dominante na remoção do dispositivo de P4 (8 dias de P4 =  $8.3 \pm 0.2$ mm vs. 7 dias de P4 =  $7.3 \pm 0.3$ mm; P=0.003) e com tendência a maior expressão de estro [8 dias de P4 = 54.5% (220/404) vs. 7 dias P4 = 48.4% (182/376); P=0.07]. Entretanto, Barbuio et al., (2020) evidenciaram que novilhas precoces ( $19,1 \pm 0,2$  meses de idade) responderam diferentemente aos tratamentos quando comparadas com novilhas tardias ( $35,5 \pm 0,2$  meses de idade). Verificou-se interação (P=0,07) entre a idade da novilha e o tempo de permanência do dispositivo de P4 na taxa de prenhez à

IATF. As novilhas tardias apresentaram efeito positivo do tratamento com 7 dias [8 Dias de P4= 40.2%<sup>b</sup> (82/204) vs. 7 dias de P4= 48.4%<sup>a</sup> (90/186)]. Entretanto, esse efeito positivo do tratamento com 7 dias não foi verificado nas novilhas precoces [8 dias de P4= 48.5%<sup>a</sup> (97/200) vs. 7 dias de P4= 46.8%<sup>a</sup> (89/190)].

Os dados são indicativos de que a redução dos dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4 de 8 para 7 dias nos protocolos de sincronização da ovulação para IATF em novilhas Nelore pode melhorar a taxa de prenhez.

Entretanto, outros fatores como idade das novilhas e manejo nutricional da fazenda podem influenciar na eficiência dos tratamentos de sincronização. Novos estudos devem ser realizados para compreender os detalhes das possíveis interações que influenciam a resposta aos protocolos de sincronização com diferentes períodos de permanência da fonte de progesterona.

## 7 CONCLUSÕES

A hipótese do Experimento 1 foi confirmada. As novilhas tratadas com P4 injetável apresentaram semelhantes taxas de indução de ciclicidade e de prenhez à IATF que as novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P4 de 4º uso. Ainda, o perfil de liberação de progesterona entre os grupos tratados com P4 também foi semelhante. Não houve diferença na taxa de prenhez à IATF dos grupos de novilhas que receberam tratamento para indução de ciclicidade (P4 injetável ou Dispositivo de P4) quando comparadas às novilhas Nelore ciclando.

A hipótese do experimento 2 foi confirmada. Não foi observado efeito negativo da remoção do tratamento com cipionato de estradiol (CE) ao término do período de exposição à P4 nas taxas de indução de ciclicidade e de prenhez à IATF em novilhas Nelore pré-púberes.

A hipótese do experimento 3 foi confirmada. A redução da dose (300 vs 200UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG) não compromete a taxa de prenhez à IATF. Além disso, as novilhas que receberam o tratamento com eCG (200 e 300UI) apresentaram aumento na taxa de prenhez à IATF quando comparadas com as novilhas não tratadas.

A hipótese do experimento 4 não foi confirmada. Foi observada interação fazenda\*tratamento na taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore sincronizadas com protocolos de 8 ou 7 dias de duração do dispositivo intravaginal de P4.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

A pecuária brasileira vem mudando seu patamar nos últimos anos. As novilhas vêm sendo trabalhadas precocemente durante a estação de monta e o uso crescente da sincronização permite a utilização da IATF em larga escala, colaborando para o incremento no melhoramento genético e na eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos. Sendo assim, é cada vez mais importante o planejamento nutricional e das estratégias reprodutivas (gestão) dos rebanhos que, juntamente com os cuidados com a sanidade, se tornarão relevantes para a boa performance. Com modelos de produção cada vez mais intensivos e rentáveis, a pecuária brasileira está galgando a passos largos rumo ao aumento de produtividade. Nesse cenário, investimentos em pacotes tecnológicos serão cada vez mais implementados.

No experimento 1 e 2 do presente estudo, foi verificado que a indução de ciclicidade traz resultados semelhantes aos alcançados com novilhas cíclicas, e que novilhas que não são induzidas têm resultados insatisfatórios na taxa de prenhez à IATF. Entretanto, animais com ou sem CL após a indução de ciclicidade, apresentam semelhantes resultados de fertilidade, sugerindo que a prévia indução ameniza os efeitos negativos da ausência de ciclicidade.

No experimento 3, o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, mesmo com a dose reduzida, aumentou o diâmetro do maior folículo no momento da IATF, a taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização, o diâmetro do CL sete dias após a IATF e a P/AI. Todos esses efeitos positivos foram verificados independentemente da dose de eCG utilizada, indicando que a dose de 200UI de eCG pode ser recomendada para novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo.

No último experimento 4, dois fatores podem afetar o resultado dos protocolos de sincronização com diferentes dias de permanência do dispositivo intravaginal de P4. Barbuio et al. (2020) verificaram que a idade dos animais pode influenciar a duração do protocolo. Novilhas mais jovens apresentaram resultados semelhantes de fertilidade aos protocolos com 7 ou 8 dias de duração. Entretanto, em novilhas mais velhas os protocolos com 7 dias apresentam melhores resultados na taxa de prenhez à IATF. No presente



estudo, verificou-se que o manejo nutricional da fazenda pode influenciar o resultado da IATF. As novilhas criadas em fazendas que recebiam suplementação proteica/energética apresentaram maiores índices de fertilidade com protocolos de 7 dias de duração do dispositivo de P4.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2018.

AMSTALDEN, M; CARDOSO, R. C; ALVES, B. R. C; WILLIAMS, G. L. Hypothalamic neuropeptides and the nutritional programming of puberty in heifers. *J Anim Sci*, 92, 3211-3222, 2014.

ANDERSON, L. H; McDOWELL, C. M; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 54, n. 54, p. 1025 – 1031, 1996.

BARBUIO, J. P; CATUSSI, B. L. C; SURDI, P. H. B; SILVA, L. G; SANTOS, M. H; FAVARO JUNIOR, A; AYRES, H; ANTONIO, D. B. A; MARQUES, M. O; MINGOTI, R. D; SÁ FILHO, M. F; BARUSELLI, P. S. Effect of time of permanence (7 vs. 8 days) of intravaginal progesterone devices on follicular dynamics and pregnancy rate of Nelore (*Bos indicus*) heifers. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. *Acta Sci. Vet. P.* 30, 2020, (abstract).

BATISTA, E. O. S; SALA, R. V; ORTOLAN, M. D. D. V; JESUS, E. F; DEL VALLE, T. A; RENNÓ, F. P; MACABELLI, C. H; CHIARATTI, M. R; SOUZA, A. H; BARUSELLI, P. S. 2020. Hepatic mRNA expression of enzymes associated with progesterone metabolism and its impact on ovarian and endocrine responses in Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) heifers with differing feed intakes. *Theriogenology* 143, 113-122.

BARUSELLI, P. S; MARQUES, M. O; MADUREIRA, E. H; COSTA NETO, W. P; GRANDINETTI, R. R; BÓ, G. A. Ovarian superovulation in embryo recipients to improve the number of corpus luteum, progesterone concentration and pregnancy rates. *Acta Sci. Vet.* 28, 218, 2000 [abstract].

BARUSELLI, P. S; REIS, E. L; MARQUES, M. O; NASSER, L. F; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P. S; REIS, E. L; CARVALHO, N. A. T; CARVALHO, J. B. P. eCG increase ovulation rate and plasma progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: XVI International Congress on Animal Reproduction, vol. 1, p. 117, 2004b, (abstract).

BARUSELLI, P. S; FERREIRA, R. M; COLLI, M. H. A; ELLIFF, F. M; SA FILHO, M. F; VIEIRA, L; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim. Reprod*, v.14, n.3, p. 558-571, 2017a.

BARUSELLI, P. S; MARQUES, M. O; BORGES, A; PENTEADO, L. IMPACTOS ECONÔMICOS DO USO DE TECNOLOGIA REPRODUTIVA NA FAZENDA. In: Encontro dos Encontros da Scot Consultoria. 4. ed. Ribeirão Preto: Suprema Gráfica e Editora, 2017b. p. 45–56.

BARUSELLI, P. S; ZANATTA, G. M; ELLIFF, F. M. Novas tecnologias aplicadas ao manejo reprodutivo de vacas de cria. ANAIS DA XIII JORNADA NESPro, Porto Alegre, RS, p. 26-34, 2018.

BERARDINELLI, J. G; DAILEY, R. A; BUTCHER, R. L; INSKEEP, E. K. Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 49, p. 1276 – 1280, 1979.

BINELLI, M; THATCHER, W. W; MATTOS, R; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v, 56, 1451–1463, 2001.

BO, G. A; ADAMS, G. P; PIERSON, R. A; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43, 31-40, 1995.

BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S; MORENO, D; CUTAIA, L; CACCIA, M.; TRÍBULO, R; TRÍBULO, H; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53–72, 2002.

BÓ, G. A; CUTAIA, L; TRIBULO R. Hormonal treatments for fixed-time artificial insemination: some experiments performed in Argentina. Second part (in Spanish). *Taurus* 15, 17–32, 2002a.

BÓ, G. A; CUTAIA, L; PERES, L. C; PINCINATO, D; MARAÑA, D; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 223–236, 2007.

BORCHARDT, S; POHL, A; CARVALHO, P. D; FRICKE, P. M; HEUWIESER, W. Short communication: effect of adding a second prostaglandin F2a injection during the Ovsynch protocol on luteal regression and fertility in lactating dairy cows: a meta-analysis. *J Dairy Sci*, 101, 1-6, 2018.

BRADFORD, B. J; ALLEN, M. S. Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol*, 34, 196-203, 2008.

BRANN, D. W; MAHESH, V. B. Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 53, p. 325-329, 1995.

BRIDGES, G. A; HELSER, L. A; GRUM, D. E; MUSSARD, M. L; GASSER, C. L; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69, 843-851, 2008.

CARBONE, S; OSVALDO, P; SZWARCFARB, B; RONDINA, D; REYNOSO, R; SCACCHI, P; MOGUILVSKY, J. A. Ontogenic modifications in the effect of the GABAergic system on the hypothalamic excitatory amino acids: its relationship with GABAergic control of gonadotrophin secretion during sexual maturation in female rats. *Developmental Brain Research*, v. 133, p. 13-18, 2002.

CARDOSO, D; NOGUEIRA, G. P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama*, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CARVALHO, E. R; RODRIGUES, A. D. P; JUNIOR, I. C; VASCONCELOS, J. L. M. Comparação entre DIB monodose e CIDR na taxa de prenhez de novilhas nelore precoce submetidas à IATF. Resumos, p.231. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.

CARVALHO, J. B. P; CARVALHO, N. A. T; REIS, E. L; NICHI, M; SOUZA, A. H; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus-Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69, 167-175, 2008.

CLARO, I; SÁ FILHO, O. G; PERES, R. F. G; AONO, F. H. S; DAY, M. L; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. *Theriogenology*, v, 74, 903–911, 2010.

CROWN, A; CLIFTON, D. K; STEINER, R. A. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* , 86, 175-182, 2007.

DAY, M. L; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. *Journal of animal science*, v. 76, n. suppl\_3, p. 1–15, 1998.

DAY, M. L; IMAKAWA, K; GARCIA-WINDER, M; ZALESKY, D. D; SCHANBACHER, B. D; KITTOK, R. J; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod*, 31, 332-341, 1984.

DAY, M. L; IMAKAWA, K; WOLFE, P. L; KITTOK, R. J; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing secretion. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DAY, M. L; NOGUEIRA, G. P. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. *Animal frontiers*, v. 3, n. 4, p. 6–11, 26 set. 2013.

DELPORTE, C. Structure and physiological actions of Ghrelin. *Scientifica*, p. 1-25, 2013.

DESJARDINS, C; HAFS, H. D. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of animal science*, v. 28, n. 4, p. 502–7, abr. 1969.

DIAS, C. C; WECHSLER, F. S; DAY, M. L; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2alpha) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology*, v. 72, n. 3, p. 378–85, ago. 2009.

DIVALL, S. A; WILLIAMS, T. R; CARVER, S. E; KOCH, L; BRUNING, J. C; KAHN, C. R; WONDISFORD, F; RADOVICK, S; WOLFE, A. Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest*, 120, 2900-2909, 2010.

DIAZ, F. J; ANDERSON, L. E; WU, Y. L; RABOT, A; TSAI, S. J; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2a production in the CL. *Mol Cell Endocrinol*, 191, 65-80, 2002.

DONAVAN, B. T; VAN DER WERFF, J. J. B. Precocious puberty in rats with hypothalamic lesions. *Nature*, v. 178, p. 745, 1956.

DRANSFIELD, M. B. G; NEBEL, R. L; PEARSON, R. E; WARNICK, L. D. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81 (7), 1874–1882

D'OCCHIO, M. J; BARUSELLI, P. S; CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 125, 277–284, 2019.

EVANS A. C. O; CURRIE. W. D; RAWLINGS. N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 96, p. 847-855, 1992.

EVANS, A. C; ADAMS, G. P; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, n. 1, p. 187–194, Jan. 1994.

FAJERSSON, P; BARRADAS, H. V; ROMAN-PONCE, H; COOK, R. M. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. *Theriogenology*, Philadelphia, v. 35, p. 845-855, 1991.

FATIMA, L. A; BARUSELLI, P. S; GIMENES, L. U; BINELLI, M; RENNÓ, F. P; MURPHY, B. D; PAPA, P. C. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reproduction, Fertility and Development*. v. 25, p. 998-1011, 2012.

FELISBINO NETO, A. R; SOUZA, D. F. C; CAMPOS, R. A; PALMIERI, R. P; FREITAS, B. G; GUERREIRO, B. M; SOUZA, E. D. F; SALES, J. N; BARUSELLI, P. S. Novilhas Nelore (*Bos indicus*) que ovulam antes da IATF tem resultados insatisfatórios na taxa de prenhez. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Ilha de Comandatuba, 2019, (resumo).

FERRAZ JR, M. V. C.; PIRES, A. V.; BIEHL, M.V.; SANTOS, M. H.; BARROSO, J. P. R, GONÇALVES, J. R. S.; SARTORI, R.; DAY, M. L. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nelore cattle. *Theriogenology*, v, 86, 1939-1943, 2016.

FERRAZ JR, M. V. C; PIRES, A. V; SANTOS, M. H; SILVA, R. G; OLIVEIRA, G. B; POLIZEL, D. M; BIEHL, M. V; SARTORI, R; NOGUEIRA, G. P. A combination of nutrition and genetics is able to reduce age at puberty in Nelore heifers to below 18 months. *Animal*, 12, 569-574, 2018.

FERRELL, C. L. Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. *Journal of animal science*, v. 55, n. 6, p. 1272– 83, dez. 1982.

FERRINI, F; SALIO, C; LOSSI, L; MERIGHI, A. Ghrelin in central neurons. *Curr Neuropharmacol*, 7, 37-49, 2009.

FUENTES, S; DE LA FUENTE, J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipient heifers. In: *Proceedings of the 13th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association: AETE*, p. 148, 1997, (abstract).

FREITAS, B. G. Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses de idade. *Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.*

FRIES, L. A; ALBUQUERQUE, L. G. Prenhez aos catorze meses: Presente e futuro. Elementos do componente genético. In: *ANAIS DA XXXVI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, p. 227–239, Porto Alegre, RS, 1999.



FRIGONI, F. G. Avaliação das variáveis envolvidas nos resultados da IATF para aumentar a eficiência reprodutiva em rebanhos de corte. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

GIMENES, L. U; SÁ FILHO, M. F; CARVALHO, N. A. T; TORRES-JÚNIOR, J. R. S; SOUZA, A. H; MADUREIRA, E. H; TRINCA, L. A; SARTORELLI, E. S; BARROS, C. M; CARVALHO, J. B. P; MAPLETOFT, R. J; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 852–8, 15 abr. 2008.

GOTTSCH, M. L; CLIFTON, D. K; STEINER, R. A. Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metabol* 15, 215-221, 2004.

GRADEN, A. P; OLDS, D; MOCHOW, C. R; MUTTER, L. R. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. *J. Dairy Sci.* 51, 778–781, 1968.

GRIMARD, B; HUMBOLT, P; PONTER, A. A; MIALOT, J. P; SAUVANT, D; THIBIER, M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil*, 104, 173-179, 1995.

GRINGS, E. E; HALL, J. B; BELLOWS, R. A; SHORT, R. E; BELLOWS, S. E; STAIGMILLER, R. B. Effect of nutritional management, trace mineral supplementation, and norgestomet implant on attainment of puberty in beef heifers. *Journal of animal science*, v. 76, n. 8, p. 2177–81, ago. 1998.

HALL, J. B; STAIGMILLER, R. B; SHORT, R. E; BELLOWS, R. A; MACNEIL, M. D; BELLOWS, S. E. Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 1606 1611, 1997.

HONARAMOOZ, A; CHANDOLIA, R. K; BEARD, A. P; RAWLINGS, N. C. Effect of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. *Theriogenology*, Philadelphia, v. 52, p. 67-79, 1999.

HONARAMOOZ, A; CHANDOLIA, R. K; BEARD, A. P; RAWLINGS, N. C. Opioidergic-dopaminérgico and adrenérgico regulation of LH secretion in pré-pubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 119, p. 207-215, 2000.

HONARAMOOZ, A; ARAVINDAKSHAN, J; CHANDOLIA, R. K; BEARD, A. P; BARTLEWSKI, P. M; PIERSON, R. A; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Animal reproduction science*, v. 80, p. 15–29, 2004.

HOHLWEG, W; DOHRN, M. Uber die beziehungen zwischen hypophysenvorderlappen und keimdrusen. *Klin Wochenschr*, v. 11, p. 233-235, 1932.

HORVATH, T. L; PU, S; DUBE, M. G; DIANO, S; KALRA, S. P. A GABA-neuropeptide Y (NPY) interplay in LH release. *Peptides*, v. 22, p. 473-481, 2001.

HUNTER, R.H.F., 1994. Causes for failure of fertilization in domestic species. In: Zavy, M.T., Geisert, R.D. (Eds.), *Embryonic Mortality in Domestic Species*. CRC Press, Boca Raton, FL, VS, pp. 1–22.

IMWALLE, D. B; PATTERSON, D. J; SCHILLO, K. K. Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 1432 – 1436, 1998.

KEISLER, D. H; DANIEL, J. A; MORRISON, C. D. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J Repord Fert (Suppl)*, 54, 425-435, 1999.

KINDER, J. E; BERGFELD, E. G; WEHRMAN, M. E; PETERS, K. E; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49 (S.1), p. 393-407, 1995.

LASKOWSKI, D; SJUNNESSON, Y; HUMBOLT, P; ANDERSON, G; GUSTAFSSON, H; BAGE, R. The functional role of insulin in fertility and embryonic development e what can we learn from the bovine model? *Theriogenology*, 86, 457-464, 2016.

LEBRETHON, M. C; AGANINA, A; FOURNIER, M; GERARD, A; PARENT, A. S; BOURGUIGNON, J. P. Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol*, 19, 181-188, 2006.

LEMES, K. M; FILHO, M. M; SANTIN, T; SILVA, M. A; CELEGHINI, E. C. C; MADUREIRA, E. H. Efeito da administração de diferentes fontes de progesterona sobre a indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça nelore. Resumos, p.241. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.

LESMEISTER, J. L; BURFENING, P. J; BLACKWELL, R. L. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. *Journal of animal science*, v. 36, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 1973.

MADUREIRA, G; CONSENTINI, C. E. C; MOTTA, J. C. L; DRUM, J. N; PRATA, A. B; MONTEIRO, P. L. J; MELO, L. F; GONÇALVES, J. R. S; WILTBANK, M. C; SARTORI, R. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle II: reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. *Theriogenology* v, 145, 86-93, 2020.

MANN, G; PAYNE, J; LAMMING, G. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2 $\alpha$  secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domestic animal endocrinology*, v. 21, n. 2, p. 127–141, ago. 2001.

MAQUIVAR, M; DAY, M. L. Estratégias nutricionais e hormonais para induzir a puberdade e seu impacto na fertilidade. In: XV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de bovinos, Uberlândia, 2011.

MARQUES, M. O; REIS, E. L; CAMPOS FILHO, E. P; BARUSELLI, P. S. Effect of eCG and estradiol benzoate for synchronization of ovulation in zebu cows during the post-partum period. In: Proceedings 5<sup>o</sup> International Symposium of Animal Reproduction, Córdoba, Argentina, p. 392, 2003, (abstract).

MARQUES, M. O; SÁ FILHO, M. F; GIMENES, L. U; FIGUEIREDO, T. B; SÓRIA, G. F; BARUSELLI, P. S. Effect of PGF2 at beginning and eCG at progesterone releasing device removal on the conception rates after FTAI in Nelore heifers. XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Acta Sci. Vet. 33, 218, 2005, (abstract).

MELVIN, E. J; LINDSEY, R. R; QUINTAL-FRANCO, J; ZANELLA, E; FIKE, K. E; VAN TASSELL, C. P; KINDER, J. E. Circulating concentrations of estradiol luteinizing-hormone and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 60, p. 405-412, 1999.

MENEGHETTI, M; MIGUEL JR, J. C. Addition of eCG on a fixed time artificial insemination protocol in the conception rate of cycling Nelore heifers. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Acta Sci. Vet. 36, 638, 2008, (abstract).

MENEGHETTI, M; SÁ FILHO, O. G; PERES, R. F. G; LAMB, G. C; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*, v. 72, n. 2, p. 179–89, 15 jul. 2009.

MONTEIRO, F. M; MERCADANTE, M. E. Z; BARROS, C. M; SATRAPA, R. A; SILVA, J.A.V; OLIVEIRA, L. Z; SARAIVA, N. Z; OLIVEIRA, C. S; GARCIA, J. M. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nelore heifers selected for postweaning weight. *Theriogenology*, 80, 10-17, 2013.

MUSSARD, M. L; BURKE, C. R; BEHLKE, E. J; GASSER, C. L; DAY, M. L. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 937–943, 2007.

NAKADA, K; MORIYOSHI, M; NAKAO, T; WATANABE, G; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone luteinizing-hormone estradiol-17 $\beta$  testosterone-progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 18, p. 57-69, 2000.

NEPOMUCENO, D. D; PIRES, A. V; FERRAZ JR, M. V. C; BIEHL, M. V; GONCALVES JR, S; MOREIRA, E. M; DAY, M. L. Effect of pre-partum dam supplementation, creepfeeding and postweaning feedlot on age at puberty in Nelore heifers. *Livest Sci*, 195, 58-62, 2017.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal reproduction science*, v. 82-83, p. 361–72, jul. 2004.

NOGUEIRA, G. P; OLIVEIRA, D. J. C. Gaba inhibitor stimulates LH secretion in pré-pubertal nellore heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. Anais, Porto Seguro: ICAR, 2004. p. 122.

ODLE, A. K; AKHTER, N; SYED, M. S; ALLENSWORTH-JAMES, M. L; BENES, H; CASTILLO, A. I. M; MACNICOL, M. C; MACNICOL, A. M; CHILDS, G. V. Gonadotropin-releasing hormone receptors as a metabolic checkpoint and gateway to reproductive competence. *Front Endocrinol* ,8(367), 1-13, 2018.

OJEDA, S. R; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: Knobil. E; Neill. J. D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994, 1878 p.

PATTERSON, D. J; PERRY, R. C; KIRACOFÉ, G. H; BELLOWS, R. A; STAIGMILLER, R. B; CORAH, L. R. Management considerations in heifer development and puberty. *Journal of animal science*, v. 70, n. 12, p. 4018–35, dez. 1992.

PERES, R. F. G; JÚNIOR, I. C; SÁ FILHO, O. G; NOGUEIRA, G. P; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 72 (5), 681-689, 2009.

PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology*, 86, 373-378, 2016.

PERRY, G. A; SMITH, M. F; ROBERTS, A. J; MACNEIL, M. D; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 684–689, 2007.

PERRY, R. C; CORAH, L. R; COCHRAN, R. C; BRETHOUR, J. R; OLSON, K. C; HIGGINS, J. J. Effects of Hay Quality, Breed, and Ovarian Development on Onset of Puberty and Reproductive Performance of Beef Heifers. *Journal of Production Agriculture*, v. 4, n. 1, p. 13, 1991

PRATA, A. B; MADUREIRA, G; ROBL, A. J; RIBEIRO, H. S; SAGAE, M; ELIAS, M. C. V; PIMENTA, C; BARRIOS, J; HARTMMAN, D; SCHNEIDER, A. A; SANDOVAL, G. A. F; WILTBANK, M. C; SARTORI, R. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: Comparison of protocol lengths. *Theriogenology*, v, 152, 29-35, 2020.

PURSLEY, J. R; SILCOX, R. W; WILTBANK, M. C. 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, 2139-2144, 1998.

RAWLINGS, N. C; EVANS, A. C. O; HONARAMOOZ, A; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, Orlando, v. 78, p. 259-270, 2003.

RESTLE, J; POLLI, V. A; SENNA, D. B. DE. Efeito de grupo genético e heterose sobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 4, p. 701–707, Apr. 1999.

RIGOGLIO, N. N; FÁTIMA, L. A; HANASSAKA, J. Y; PINTO, G. L; MACHADO, A. S. D; GIMENES, L. U; BARUSELLI, P. S; RENNÓ, F. P; MOURA, C. E. B; WATANABE, I; PAPA, P. C. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 79, 673–679, 2013.

ROA, J; GARCIA-GALIANO, D; CASTELLANO, J. M; GAYTAN, F; PINILLA, L. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*, 324, 87-94, 2010.

ROA, J; TENA-SEMPERE, M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metabol*, 21, 519-528, 2010.

ROBERSON, M. S; WOLFE, M. W; STUMPF, T. T; KITTOK, R. J; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod* 1989; 41:997–1003.

RODRIGUES, A. D. P; PERES, R. F. G; DAY, M. L; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of eCG and P4 level in timed AI programs in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers. *J Dairy Sci*, 99(E-suppl. 1):502, 2016, (abstract).

RODRIGUES, A. D. P; PERES, R. F. G; LEMES, A. P; MARTINS, T; PEREIRA, M. H. C; DAY, M. L; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nellore heifers. *Theriogenology* 79, 135–141, 2013.

RODRIGUES, A. D. P; PERES, R. F. G; LEMES, A. P; MARTINS, T; PEREIRA, M. H. C; CARVALHO, E. R; DAY, M. L; VASCONCELOS, J. L. M; Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocol on pregnancy rate in Nellore heifers. *Theriogenology* 82, 760–766, 2014.

RODRIGUES, H. D; KINDER, J. E; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 66, p. 603-609, 2002.

ROELOFS, J. B; VAN EERDENBURG, F. J. C. M; SOEDE, N. M; KEMP, B. 2005. Various behavioral signs of estrus and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 63, 1366–1377.

ROSEWEIR, A. K; MILLAR, R. P. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update*, 15, 203-212, 2009.

SÁ FILHO, M. F; BALDRIGHI, J. M; SALES, J. N. S; CREPALDI, G. A; CARVALHO, J. B. P; BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*, v. 129, n. 3-4, p. 132–9, dez. 2011.

SÁ FILHO, M. F; CRESPILO, A. M; SANTOS, J. E. P; PERRY, G. A; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestinbased protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science*, v. 120, n. 1-4, p. 23–30, jul. 2010b.

SÁ FILHO, M. F; CRESPILO, A. M; SANTOS, J. E. P; PERRY, G. A; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* v, 120, 23-30, 2010.



SÁ FILHO, M. F; FERREIRA, R. M; AYRES, H; MARQUES, M. O; REIS, E. L; SILVA, R. C. P; RODRIGUES, C. A; MADUREIRA, E. H; BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 73, 651–658, 2010b.

SÁ FILHO, M. F; GIMENES, L. U; SALES, J. N. S; CREPALDI, G. A; MEDALHA, A; BARUSELLI, P. S. FTAI in Heifers. In: 3rd International Symposium of Applied Animal Reproduction, Londrina, Brazil, pp. 54–67, 2008b.

SÁ FILHO, M. F; NASSER, L. F. T; PENTEADO, L; PRESTES, R; MARQUES, M. O; FREITAS, B. G; MONTEIRO, B. M; FERREIRA, R. M; GIMENES, L. U; BARUSELLI, P. S. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. *Animal reproduction science*, 30 jun. 2015.

SÁ FILHO, M. F; PENTEADO, L; REZENDE, C. R; NASSER, L. F. T; CRESPILO, A. M; SALES, J. N. S; SANTOS, J. E. P; FERREIRA, R. M; AYRES, H; CREPALDI, G. A; BARUSELLI, P. S. Factors associated to ovarian response and fertility of beef cows submitted to FTAI. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. *Acta Sci. Vet.* 36, 606, 2008a, (abstract).

SÁ FILHO, M. F; TORRES JUNIOR, J. R. S; PENTEADO, L; GIMENES, L. U; FERREIRA, R. M; AYRES, H; CASTRO E PAULA, L. A; SALES, J. N. S., BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 182–187, 2010a.

SÁ FILHO, M. F; TORRES-JÚNIOR, J. R. S; PENTEADO, L; GIMENES, L. U; FERREIRA, R. M; AYRES, H; CASTRO E PAULA, L. A; SALES, J. N. S; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal reproduction science*, v. 118, n. 2-4, p. 182–7, abr. 2010c.

SÁ FILHO, O. G; MENEGHETTI, M; PERES, R. F. G; LAMB, G. C; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. v. 72, p. 210-8, 2009.

SALES, J. N. S; CREPALDI, G. A; DIAS, L. M. K; TEIXEIRA, A. A; CARDOSO, G. G. C; GRANDINETTI, R. R; OLIVEIRA, V. G; COMBI, I. M; BARUSELLI, P.S. Evaluation of diferente protocols to induce cyclicity in prepubertal beef heifers. *Animal Reproduction*, v 6, p, 234, 2008.

SALES, J. N; CREPALDI, G. A; GIROTTO, R. W; SOUZA, A. H; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*, 124, 12–18, 2011.

SAMADI, F; BLACHE, D; MARTIN, G. B; D'OCCHIO, M. J. Nutrition, metabolic profiles and puberty in Brahman ( *Bos indicus*) beef heifers. *Anim Reprod Sci*, 140, 134-142, 2014.

SAMADI, F; PHILLIPS, N. J; BLACHE, D; MARTIN, G. B; D'OCCHIO, M. J. Interrelationships of nutrition, metabolic hormones and resumption of ovulation in multiparous suckled beef cows on subtropical pastures. *Anim Reprod Sci*, 137, 137-144, 2013.

SANTOS, M. H; FERRAZ JUNIOR, M. V. C; POLIZEL, D. M; BARROSO, J. P. R; MISZURA, A. A; MARTINS, A. S; BERTOLINI, A. V; OLIVEIRA, G. B; PIRES, A. V. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nelore cows. *Theriogenology*, 111, 56-61, 2018.

SCHAMS, H; SCHALLENBERGER, E; GOMBE, S; KARG, H. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 30, p. 103-110, 1981.

SCHILLO, K. K; HANSEN, P. J; KAMWANJA, L. A; DIERSCHKE, D. J; HAUSER, E. R. Influence of season on sexual development in heifers: age at puberty as related to growth and serum concentrations of gonadotropins-prolactina- thyroxine and progesterone. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 28, p. 329-341, 1983.

SOUZA, A. H; VIECHNIESKI, S; LIMA, F. A; SILVA, F. F; ARAUJO, R; BÓ, G.A; WILTBANK, M.C; BARUSELLI, P.S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*. v. 72, p. 10-21, 2009.

TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology*, 83, 275-281, 2006.

TENA-SEMPERE, M. The roles of kisspeptin and G protein-coupled receptor-54 in pubertal development. *Curr Opin Pediatr*, 18, 442-447, 2006.

THATCHER, W. W; MOREIRA, F; SANTOS, J. E. P; MATTOS, R. C; LOPEZ, F. L; PANCARCI, S. M; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75–90, 2001.

VASCONCELOS, J. L; SARTORI, R; OLIVEIRA, H. N; GUENTHER, J. G; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56, 307–314, 2001.

VIZCARRA, J. A; WETTEMANN, R. P; SPITZER, J. C; MORRISON, D. G. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and non esterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci*, 76, 927-936, 1998.

WATHES, D. C; POLLOTT, G. E; JOHNSON, K. F; RICHARDSON, H; COOKE, J. S. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal*, 8, 91-104, 2014.

WERTZ-LUTZ, A. E; KNIGHT, T. J; PRITCHARD, R. H; DANIEL, J. A; CLAPPER, J. A; SMART, A. J; TRENKLE, A; BEITZ, D. C. Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *J Anim Sci*, 84, 3285-3300, 2006.

WYLIE, A. R. G. Leptin in farm animals: where are we and where can we go? *Animal*, 5, 246-267, 2011.

YAVAS, Y; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25 - 55, 2000.

YELICH, J. V; WETTERMANN, R. P; MARSTON, T. T; SPICER, L. J. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v. 13, n. 4, p. 325 – 338, 1996.