MARCOS HENRIQUE ALCANTARA COLLI

Resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes tratadas com Kisspeptina ou GnRH no momento da IATF

São Paulo

2018

MARCOS HENRIQUE ALCANTARA COLLI

**Resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes
tratadas com Kissseptina ou GnRH no momento da IATF**

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:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3726
FMVZ

Colli, Marcos Henrique Alcantara
Resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes tratadas com Kissseptina ou GnRH no momento da IATF / Marcos Henrique Alcantara Colli. – 2018.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

1. Novilha. 2. Bos indicus. 3. Pré-Púbere. 4. Neuropeptídios. 5. Ovulação. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com Kisspeptina ou de GnRH no momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) na taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes", protocolada sob o CEUA nº 6254090218 (ID 005499), sob a responsabilidade de **Pietro Sampalo Baruselli e equipe; Marcos Henrique Alcantara Colli; Flávia Morag Elliff** - 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 19/09/2018.

We certify that the proposal "Effect of Kisspeptin or GnRH treatment at fixed time artificial insemination (FTAI) moment on pregnancy rate of prepubertal Nelore heifers", utilizing 576 Bovines (576 females), protocol number CEUA 6254090218 (ID 005499), under the responsibility of **Pietro Sampalo Baruselli and team; Marcos Henrique Alcantara Colli; Flávia Morag Elliff** - 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 09/19/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2018** a **08/2018**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **12 a 16 meses**

N: **36**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **230 a 350 kg**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **12 a 16 meses**

N: **540**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **230 a 350 kg**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados em fazendas comerciais localizadas no estado do Mato Grosso do Sul. O experimento 1 será realizado na Fazenda Tatui, localizada na cidade de Ribas do Rio Pardo, MS. O experimento 2 será realizado da Fazenda Engano, localizada na cidade de Camapuã, MS.

São Paulo, 28 de setembro de 2018

Prof. 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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: COLLI, Marcos Henrique Alcantara

Título: Resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes tratadas com Kisspeptina ou GnRH no momento da IATF

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. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Para **Elizabete Alcantara Colli, Marcos Luiz Colli e Karoline Alcantara Colli**
por terem aceitado a graça do pai celestial para que, fizéssemos parte do mesmo lar
e, pudéssemos cultivar os mais bonitos princípios do amor e do bem.*

*Por tantos momentos que passamos juntos ou distantes, eu sempre soube que
não estava desamparado, portanto, esse trabalho é fruto do **esforço mútuo** de todos
nós.*

À vocês eu o dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli pelo convite da orientação de mestrado durante este período. Muito obrigado por me proporcionar conviver e aprender através de seus bons exemplos na conduta da pesquisa científica, profissional e pessoal.

Aos amigos e mais que parceiros Marinho Ribeiro, Márcio Marques e Rubinho Silva da Geraembryo. Por todas as oportunidades a mim concedidas e por sempre acreditarem no potencial do meu trabalho.

Aos amigos e professores da graduação - UEM (Antonio Campanha Martinez, Welber Daniel Zanetti Lopes, Adriana Aparecida Pinto e Fabrício Singaretti de Oliveira) por terem me iniciado na vida científica e também aos funcionários (Valdomiro Pereira, Ivan Carrito e Marcos Cezar) por todo o suporte durante este período.

Aos amigos da UEM: Pedro (Pedrão), Gabriel (Bomba), Maycon (Gambá), Joaquim (Kinkão), Rafael (Mineiro), Walter (Tuba), Augusto (Arba-Tuto), Matheus (Catari), Matheus (Buda); Lucas (Mastite), Aline, Karina (Pri), Dani Lachner e Lenise (Lenisão) com quem pude crescer e amadurecer muito durante este período.

Aos Pietrinhos: Rodolfo (Badá), Bruno (Carboxy), Romulo (Doidão), Bernardo (Bê), Mariana (Palú), Flávia (Dotôra Fraba), Guilherme (Gaúcho-Tchê), Walter (Tuba), Laísa (Doidinha), Augusto (Felisbino Roy), Fábio (Frigoni), Lisbek (Béklis), Mari (Mãe de Todos), Damiana (Flamivet) Bruna (Mademosele), Lais (Namorada do Serjão) e Tiago (Serjão Berranteiro) que sempre foram muito solícitos em ajudar o máximo. Possibilitando trabalhar como se fossemos um só, vivenciando o verdadeiro espírito de equipe e união. Aos Pietrossauros: Manoel Sá Filho, José Nélio, Roberta Ferreira, Alex Souza, Emiliana Batista, Laís Vieira, Gustavo Macedo, Márcio Marques, Bruna Guerreiro, Gabriel Crepaldi, Nélcio Carvalho, Júlia Soares, Everton Reis e Evandro Souza que tive a oportunidade de conhecer e aprender sobre a história do grupo. A todos vocês, muito obrigado por fazer o nome deste grupo ser reconhecido como referência.

Aos professores e professoras do VRA: Mayra, Cláudia, Marcílio, Guilherme, Mário, Ed, Anneliese, Ricardo, Visintin, Carla, Rubens, Camila e André.

Aos amigos de departamento: Brunão, Giulia, João Diego, Marcel, Fura, Maíra, Tamie, Camila's, Gabizoca, Higor, Cecília e Gabi Dalmaso.

Aos amigos externos de outros programas: Dado, Gui, Rodrigo, Luis, Giribóia Betinho, Mineiro e Frangão.

À Harumi, que sempre nos lembrou dos prazos e deveres da pós-graduação. Muito obrigado pelos lembretes e sempre estar tão disposta e entusiasmada em nos ajudar. Às secretárias Roberta e Lóide por toda a prestatividade.

Ao Charles Richard Looney e sua esposa Cathryn Cannon Looney por toda hospitalidade e suporte durante meu período nos Estados Unidos. Muito obrigado pelo convite e ter me concedido o intercâmbio na OvaGenix. Ao David Forrest por ter sempre estar disposto em ajudar na minha ida para os EUA e ter concedido, em partes, esta oportunidade. Ao Garrett Cline e Jonathan Chachere pela amizade, paciência e ensinamentos do dia-a-dia. Também ao Aaron e Keena (*“best couple ever”*) pela amizade e receptividade. Também aos internos Richard Longoria e Lohana Fernandez Monteiro nos momentos de trabalho e descontração. À Família Walker pela recepção, especialmente ao Josh Walker pela disponibilidade em ajudar e fornecer os animais para realização de alguns experimentos. Aos amigos do rolê Rafael, Roberta, Juliana, Cinthya, David, Matthew e Ifed. Com toda a certeza, vocês fizeram meu período nos EUA mais divertido.

Ao Sr Márcio Spessotto e Sra. Cristiane Risolia Vieira Spessotto, por permitir a realização do Experimento 1 na fazenda Tatuí (Ribas do Rio Pardo – MS) e ao Rogério por todo o suporte durante a condução do experimento.

Ao Sr. Paulo Aranha, por permitir a realização do Experimento 2 na fazenda Engano (Camapuã – MS) e aos gerentes Evaldo e Hilton por toda a ajuda durante este período. Também aos meninos da “Lagoa” Cezinha, João Pedro, Lucas e Rogério pela companhia durante o período de Engano.

À Ouro Fino Saúde Animal pelo fornecimento do GnRH e Kisspeptina, em nome de Bruno Gonzales de Freitas e José Ricardo de Maio.

A todos os veterinários com quem tive a oportunidade de aprender e me espelhar durante essa trajetória.

À todas as empresas e veterinários do setor privado que investem/ investiram em projetos em parceria conosco, muito obrigado por fomentarem muitas de nossas pesquisas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

The beginning is the most important thing – Frank Sherman Land

If you can dream it, you can do it – Walt Disney

Mystery creates wonder and wonder is the basis of man's desire to
understand – Neil Armstrong

Don't be afraid to go after you want to do, and what you want to be.
But don't be afraid to be willing to pay the price – Lane Clyde Frost

RESUMO

COLLI, MHA. **Resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-púberes tratadas com Kissseptina ou GnRH no momento da IATF.** [Follicular response and pregnancy rate of prepubertal Nelore heifers treated with Kissseptin or GnRH at TAI]. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Objetivou-se nesse estudo avaliar a sincronização da ovulação, taxa de ovulação, taxa de prenhez e perda gestacional após o tratamento com Kissseptina (Kp) ou GnRH no momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em novilhas Nelore pré-púberes de 14 meses de idade. No Experimento 1, avaliou-se o momento, dispersão e taxa de ovulação. No Experimento 2, avaliou-se a taxa de ovulação, diâmetro do corpo lúteo (CL) pós ovulação, taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a IATF, bem como a perda gestacional. Em ambos os experimentos foram utilizadas somente novilhas pré-púberes (sem CL) avaliadas por dois exames ultrassonográficos com intervalo de 10 dias. As novilhas foram sincronizadas com um implante auricular contendo 3mg de Norgestomet associado ao tratamento intramuscular (i.m.) de 1mg de benzoato de estradiol (BE) no D0. Após 8 dias (D8), o implante foi removido e as novilhas receberam 200UI i.m. de gonadotrofina coriônica equina (eCG), 0,5mg i.m. de cipionato de estradiol (CE) e 0,265mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF). Após 48 horas da remoção do implante auricular (D10), as novilhas foram distribuídas em um de três grupos experimentais. Controle: sem tratamento adicional; Kiss: tratamento i.m. com 3,0mg de Kissseptina-10 e; GnRH: tratamento i.m. com 0,01mg de acetato de buserelina. No Experimento 1, foram utilizadas 30 novilhas (Controle, N=10, Kiss, N=10 e; GnRH, N=10) avaliadas por ultrassonografia no D8am (0h), D9am (24h), D10am (48h), D10pm (60h), D11am (72h), D11pm (84h) para mensurar o diâmetro do maior folículo (MF) e o momento da ovulação. No Experimento 2, 592 novilhas foram inseminadas em tempo fixo (Controle, N=200, Kiss, N=198 e; GnRH, N=194). Foram realizadas avaliações ultrassonográficas no D8 e D10 para mensuração do MF e no D17 para confirmar a ovulação e mensurar o CL, no D40 e D70 para avaliar a taxa de prenhez e perda gestacional. No Experimento 1 não se verificou efeito de tratamento para o tamanho do folículo ovulatório ($P=0,51$), momento ($P=0,51$), taxa ($P=0,83$) e dispersão da ovulação ($P=0,62$). No Experimento 2, não se verificou efeito de

tratamento na taxa de ovulação ($P=0,38$), taxa de prenhez aos 30 ($P=0,77$) e 60 dias ($P=0,50$) e perda gestacional ($P=0,17$). Verificou-se efeito da expressão de estro na taxa de ovulação ($P<0,0001$) e de prenhez aos 30 ($P=0,03$) e 60 dias ($P=0,003$). Não se verificou efeito de estro na perda gestacional ($P=0,98$). Verificou-se interação tratamento*estro para taxa de ovulação ($P=0,04$). Novilhas tratadas com GnRH apresentaram taxa de ovulação semelhante, independentemente da manifestação de estro. Entretanto, esse resultado não foi verificado nas novilhas do grupo controle e Kiss. Não se verificou interação tratamento*estro na taxa de prenhez aos 30 ($P=0,24$) e 60 dias ($P=0,63$) e, perda gestacional ($P=0,99$). Conclui-se que o tratamento com Kiss ou GnRH não melhora a sincronização, taxa de ovulação, prenhez aos 30 e 60 dias e, perda gestacional. Entretanto, as novilhas que demonstraram estro apresentaram maior taxa de ovulação, prenhez aos 30 e 60 dias após a IATF.

Palavras-chave: Novilha. *Bos indicus*. Pré-Púbere. Neuropeptídios. Ovulação.

ABSTRACT

COLLI, MHA. **Follicular response and pregnancy rate of prepubertal Nellore heifers treated with Kisspeptin or GnRH at TAI.** [Follicular response and pregnancy rate of prepubertal Nellore heifers treated with Kisspeptin or GnRH at TAI]. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The objective of this study was to evaluate the synchronization of ovulation, ovulation rate, pregnancy rate and pregnancy loss after treatment with Kisspeptin (Kiss) or GnRH at timed artificial insemination (TAI) in 14-month old prepubertal Nellore heifers. On Experiment 1, ovulation was evaluated regarding moment, dispersion and rate. On Experiment 2, ovulation rate, corpus luteum (CL) diameter post-ovulation, pregnancy rate 30 and 60 days after TAI and pregnancy loss were evaluated. Both experiments used only prepubertal heifers (without CL) evaluated by two ultrasound examinations with an interval of 10 days. The heifers were synchronized with an auricular implant containing 3mg of Norgestomet associated to an intramuscular (i.m.) treatment of 1mg of estradiol benzoate (EB) on D0. After 8 days (D8), the implant was removed and the heifers received 200IU i.m. of equine chorionic gonadotropin (eCG), 0.5mg i.m. of estradiol cypionate (EC) and 0.265mg i.m. of sodic cloprostenol (PGF). After 48 hours of the auricular implant removal (D10), heifers were distributed into three experimental groups. Control: without additional treatment; Kiss: i.m. treatment with 3.0mg of Kisspeptin-10 and; GnRH: i.m. treatment with 0.01mg of buserelin acetate. On Experiment 1, 30 heifers (Control, N=10; Kiss, N=10; GnRH, N=10), were evaluated using ultrasonography on D8am (0h), D9am (24h), D10am (48h), D10pm (60h), D11am (72h), D11pm (84h) to measure the diameter of the largest follicle (LF) and moment of ovulation. On Experiment 2, 592 heifers were submitted to timed artificial insemination (Control, N=200; Kiss, N=198 and; GnRH, N=194). Ultrasound evaluations were performed on D8 and D10 to measure the LF and on D17 to confirm ovulation and to measure the CL, on D40 and D70 to evaluate pregnancy rate and pregnancy loss. On Experiment 1 no treatment effect was verified for ovulatory follicle size ($P=0.51$), moment ($P=0.51$), rate ($P=0.83$) and dispersion of ovulation ($P=0.62$). On Experiment 2, no treatment effect was verified for ovulation rate ($P=0.38$), pregnancy rate at 30 ($P=0.77$) and 60 days ($P=0.50$) and pregnancy loss ($P=0.17$).

Estrus expression effect was verified on ovulation ($P < 0.0001$) and pregnancy rates at 30 ($P = 0.03$) and 60 days ($P = 0.003$). No estrus effect was observed on pregnancy loss ($P = 0.98$). Treatment*estrus interaction was verified on ovulation rate ($P = 0.04$). Heifers treated with GnRH presented similar ovulation rate, independently of estrus manifestation. However, this result was not verified for heifers of the control and Kiss groups. Treatment*estrus interaction was not verified on pregnancy rate at 30 ($P = 0.24$) and 60 days ($P = 0.63$) and, on pregnancy loss ($P = 0.99$). It is concluded that treatment with Kiss or GnRH does not improve synchronization, ovulation rate, pregnancy at 30 and 60 days and pregnancy loss. However, heifers that demonstrate estrus presented higher ovulation rate and pregnancy 30 and 60 days after TAI.

Keywords: Heifer. *Bos indicus*. Prepubertal. Neuropeptides. Ovulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura esquemática do modelo de mudanças do metabolismo no controle e secreção de LH...31

Figura 2 - Características estruturais das kisspeptinas, produto do gene Kiss1. A Prepro-Kisspeptina é uma proteína que contém 154 aminoácidos, uma região sinal com 19 aminoácidos e uma região central de 54 aminoácidos, a Kisspeptina-54. Formas de baixo peso molecular que incluem a Kp-14, Kp-13 e Kp-10. Todas as kisspeptinas são capazes de se ligar e ativar o Kiss1r32

Figura 3 - Desenho do modelo hipotético do Experimento 1 para avaliar a resposta ovariana e dinâmica da dispersão da ovulação.....35

Figura 4 - Esquema do delineamento experimental para avaliar dinâmica da dispersão e do momento da ovulação. Foi realizado um protocolo à base de P4/E2. No primeiro dia (D0) foi inserido um implante auricular contendo 3mg de Norgestomet (P4) associado ao tratamento de 1mg de benzoato de estradiol (BE), oito dias após o implante foi removido e as novilhas foram tratadas com 0,5mg de cipionato de estradiol, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,265mg de cloprostenol sódico (PGF). No D10, 48h após a remoção o implante de P4 as novilhas foram submetidas à receberem um de três tratamentos, Grupo Controle, N = 10, Grupo Kiss, N = 10 e Grupo GnRH, N = 10. Exames ultrassonográficos no D-10 e D0 para avaliação da ciclicidade. Ultrassonografia no D8 (0h), D9 (24h após a remoção do implante de P4), D10 (48h e 60h após a remoção do implante de P4) e no D11 (72h e 84h após a remoção do implante de P4). Ultrassonografia no D17 para confirmação da ovulação.38

Figura 5 - Figura 5. Desenho do modelo hipotético do Experimento 2 para avaliar a taxa de ovulação e taxa de prenhez.....39

Figura 6 - Delineamento experimental para avaliação da taxa de ovulação e taxa de prenhez. Foi realizado um protocolo à base de P4/E2. No primeiro dia (D0) foi inserido

im implante auricular contendo 3,0 mg de Norgestomet (P4) associado ao tratamento de 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE), oito dias após o implante foi removido e as novilhas foram tratadas com 0,5mg de cipionato de estradiol, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,265mg de cloprostenol sódico (PGF). No D10, 48h após a remoção o implante de P4 as novilhas foram submetidas à IATF e receberam um de três tratamentos, Grupo Controle, N = 200, Grupo Kiss, N = 198 e Grupo GnRH, N = 194. Exames ultrassonográficos no D-10 e D0 para avaliação da ciclicidade. Ultrassonografia no D8 (0h), D10 (48h após a remoção do implante de P4) para mensuração do maior foículo (♂MF). Ultrassonografia no D17 para confirmação da ovulação (cOvu) e mensuração do CL (♂CL). Ultrassonografia (US) para diagnóstico de gestação aos 30 dias (DG1) e aos 60 dias após a IATF (DG2), no D40 e D70, respectivamente.43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações endócrinas durante a pré e peri-puberdade para a puberdade em novilhas.	29
Tabela 2 - Variáveis explanatórias e efeitos dos tratamentos com Kiss e GnRH como indutores de ovulação nas respostas foliculares de novilhas da raça Nelore submetidas à um protocolo de sincronização para IATF à base de P4 e E2.	44
Tabela 3 - Variáveis explanatórias de novilhas Nelore previamente ao tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).	46
Tabela 4 - Efeito das classes de idade, peso, ECC e ETR na taxa de ovulação de novilhas Nelore pré-púberes conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).....	49
Tabela 5 - Efeito das classes de idade, peso, ECC e ETR na taxa de prenhez 30 dias após à IATF de novilhas Nelore pré-púberes conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina no momento da IATF)	51
Tabela 6 - Respostas foliculares, taxa de prenhez à IATF e perda gestacional de acordo com a ocorrência ou não de estro entre o momento da retirada do implante de P4 e a IATF.....	53
Tabela 7 - Efeito da ocorrência do estro e do tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina) no momento da IATF em novilhas pré-púberes da raça Nelore.....	54

Tabela 8 - Resultados obtidos em novilhas pré-púberes da raça Nelore conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina recebido no momento da IATF).....57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dispersão da ovulação de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento do D10 do protocolo de sincronização para IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).45

Gráfico 2 - Taxa de ovulação IATF de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).48

Gráfico 3 - Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).50

Gráfico 4 - Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme a expressão de estro entre a retirada da fonte exógena de P4 e a IATF.52

Gráfico 5 - Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore de acordo com a expressão de estro e conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina recebido no momento da IATF).52

Gráfico 6 - Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o diâmetro do MF no momento da IATF.....55

Gráfico 7 - Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o diâmetro do MF no momento da IATF e conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina no momento da IATF).56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
	2.1. Importância e utilização dos protocolos de IATF.....	25
	2.2. Importância da idade à puberdade para a pecuária de corte	27
	2.3. Mecanismos fisiológicos da puberdade e maturidade sexual	28
	2.4. Nutrição, metabolismo, puberdade e suas interações.....	29
	2.5. Síntese e mecanismo de ação da Kisspeptina.....	31
	2.6. A Kisspeptina como reguladora da reprodução e da puberdade	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
	Manipulação e administração da Kisspeptina	34
	3.1. Experimento 1 – Resposta folicular e taxa de ovulação.....	34
	3.1.1. Objetivos	34
	3.1.2. Hipóteses	35
	3.1.3. Animais e Manejo.....	35
	3.1.4. Protocolo hormonal para sincronização e tratamentos.....	36
	3.1.5. Expressão de estro	36
	3.1.6. Avaliações ultrassonográficas	36
	3.1.7. Análises Estatísticas	37
	3.2. Experimento 2 – Taxa de ovulação e prenhez	38
	3.2.1. Objetivos	38
	3.2.2. Hipóteses	39
	3.2.3. Animais e Manejo.....	39
	3.2.4. Protocolo hormonal e tratamentos	40
	3.2.5. Expressão de estro	41
	3.2.6. Avaliações ultrassonográficas.....	41
	3.2.7. Análise Estatística.....	42
4	RESULTADOS	44
	4.1. Resultados do Experimento 1 - Resposta folicular e taxa de ovulação.....	44

4.2. Resultados do Experimento 2 – Taxa de ovulação, taxa de prenhez e perda gestacional.....	46
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	65
6.1. No Experimento 1 foi possível concluir que:.....	65
6.2. No Experimento 2 foi possível concluir que:.....	65
6.3. Conclusões gerais	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é considerado o maior rebanho comercial do mundo, sendo composto por 214.899.796 milhões de bovinos (IBGE, 2017). O Brasil, em sua vasta extensão territorial, se destaca dentre os países com grande capacidade para aumentar a oferta de alimentos para o mundo. Estima-se que a produção de carne bovina brasileira deve apresentar crescimento de cerca de 2,1% ao ano entre 2015 e 2024, sendo esse crescimento capaz de abastecer o mercado interno, assim como, a demanda nas exportações (OECD-FAO, 2015). Este cenário faz com que o Brasil contribua com aproximadamente 20% do mercado global de carnes (LOBATO et al., 2014). Entretanto, a expansão da agricultura sobre áreas de pecuária, impulsionada pelos preços dos grãos, força os pecuaristas elevar a produtividade de forma vertical e sustentável, aumentando a produção por área da propriedade.

Neste novo modelo de sistema de produção, é necessária a adoção do conceito de “pecuária de ciclo curto”, ou seja, o abate dos machos deve ocorrer até os dois anos de idade e as novilhas devem ser inseminadas ao sobreano, abolindo e/ou encurtando o período de recria nas propriedades, gerando maior produtividade e renda. Para garantir esse modelo de produção, no sistema cria para produção de bezerros, deve-se adotar biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) aliada ao melhoramento genético, com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos.

Atualmente, o rebanho bovino brasileiro é composto por 72.091.026 milhões de fêmeas em idade reprodutiva (consideradas as fêmeas acima de 24 meses; ANUALPEC, 2018). Ademais, novilhas de idade variando de 12 a 23 meses representam quantidade expressiva de 26.283.209 de cabeças (ANUALPEC, 2018). De maneira geral, os programas de melhoramento procuram otimizar a utilização da categoria de novilhas para acelerar o ganho genético por meio da diminuição do intervalo de gerações. Entretanto, via de regra, as novilhas normalmente são negligenciadas nos programas reprodutivos, especialmente as novilhas jovens.

De acordo com Nogueira (2004), aproximadamente 80% dos bovinos no Brasil são de origem zebuína (*Bos indicus*) ou cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Os zebuínos quando expostos às condições tropicais de manejo, apresentam maior tolerância aos desafios nutricionais e climáticos. Entretanto, são caracterizados por atingirem tardiamente a puberdade (ABEYGUNAWARDENA; DEMATAWEWA, 2004;

NOGUEIRA, 2004). Isto reflete à elevada idade à puberdade (que varia entre 22 e 36 meses; NOGUEIRA, 2004), faz com que a cobertura ocorra tardiamente com a idade ao primeiro parto entre os 36 e 48 meses (SOUZA et al., 1995; MALHADO et al., 2013). Esses dados são indicativos de que as novilhas de corte iniciam sua vida reprodutiva ao redor dos 3 anos de idade.

Estudos evidenciaram que existe elevada porcentagem de novilhas pré-púberes no início da estação de monta nas condições brasileiras de manejo (CLARO JÚNIOR et al., 2010). A idade a puberdade e idade ao primeiro parto afeta diretamente a vida produtiva da vaca (LESMEISTER; BURFENING; BLACKWELL, 1973; PERRY; CUSHMAN, 2013; PERRY, 2016). Sendo assim, as novilhas que atingem tardiamente a puberdade permanecem na fazenda e ocupam áreas de pastagens que poderiam ser destinadas a outras categorias (ELER; FERRAZ; TEIXEIRA, 2010; FERREIRA et al., 2012). Este fato reduz a eficiência reprodutiva e a produtividade das propriedades de corte.

A puberdade pode ser definida como o período que ocorre após a primeira ovulação, seguida por uma fase luteínica de duração normal e com oportunidade de concepção (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013; PERRY, 2016). Alguns fatores inerentes ao grupo genético (NOGUEIRA, 2004), idade (HALL et al., 1997), ganho de peso (CARDOSO et al., 2014a; ALVES et al., 2015) e desenvolvimento do trato reprodutivo (HOLM; THOMPSON; IRONS, 2009) podem afetar a maturação e o funcionamento do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HHG). Os primeiros estudos que evidenciaram as interações do HHG no bloqueio ou a estímulo da secreção de gonadotrofinas, principalmente o LH, datam da década de 80. Nesse período foi relatada a excessiva sensibilidade hipotalâmica ao estrógeno em novilhas pré-púberes (DAY et al., 1984, 1987). Entretanto, quase 20 anos após foram relatadas as primeiras evidências da relação da Kisspeptina (Kp) com a reprodução (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Evidenciou-se que mutações que causam a perda da funcionalidade do receptor de Kiss (Kiss1r) em roedores e humanos foram associadas ao atraso do início da puberdade e hipogonadismo-hipogonadotrófico, em consequência da redução na secreção de GnRH (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). A Kp possui papel importante no controle do eixo reprodutivo e se mostra fundamental para o início da puberdade (PLANT; RAMASWAMY; DIPIETRO, 2006; ROSEWEIR; MILLAR, 2009). A maturação do eixo neuroendócrino e reprodutivo é caracterizado pelo aumento na frequência da liberação de LH (FOSTER; KARSCH,

1975; HUFFMAN; INSKEEP; GOODMAN, 1987; FOSTER, D.L., JACKSON, 2006) em resposta ao aumento da liberação de GnRH (WATANABE; TERASAWA, 1989) conforme o desenvolvimento etário. Elevadas concentrações de LH no final do desenvolvimento folicular estimulam o crescimento, a esteroidogênese, e por fim, a ovulação (FOSTER, D.L., JACKSON, 2006). Entretanto, os neurônios secretores de GnRH não possuem receptores de estrógeno (LEHMANN; KARSCH, 1993), sugerindo que a Kp está intimamente relacionada aos processos que envolvem a regulação da pulsatilidade e do pico GnRH/LH para indução da ovulação (MACEDO et al., 2019). Atualmente existem algumas estratégias hormonais que vêm sendo desenvolvidas com objetivo de aumentar a proporção de novilhas púberes no início da estação de monta. Dentre elas merecem destaque a exposição prévia à P4 e ao E2 para indução da ovulação e da ciclicidade (RODRIGUES et al., 2014; SÁ FILHO et al., 2015). A indução de puberdade previamente à IATF, como é conhecida, ainda possuem resultados controversos. De acordo com Rodrigues et al., 2014; Sá Filho et al., 2015, novilhas que foram induzidas com P4 e E2 apresentaram maior taxa de prenhez à IATF que as novilhas controle (não induzidas). Entretanto, em estudo conduzido por Freitas (2015) não foram encontradas diferenças na taxa de prenhez entre os grupos de novilhas Nelore que receberam ou não o tratamento de indução de ciclicidade 22 dias antes da IATF.

Após um protocolo de IATF, a taxa de ovulação em novilhas Nelore de 14 meses é de cerca de 70 a 75% (FREITAS, 2015). Já em novilhas Nelore de 24 meses, verificou-se 90% de taxa de ovulação após o protocolo de sincronização para IATF (SÁ FILHO et al., 2010d; RODRIGUES et al., 2014). Esses dados são indicativos de que a taxa de ovulação é considerada baixa em novilhas Nelore de 14 meses após o protocolo de sincronização para IATF, o que projeta taxa de prenhez ao redor de 35 e 48,5% (FREITAS, 2015). A baixa taxa de ovulação observada em novilhas Nelore precoce pode estar associada à sensibilidade hipotalâmica excessiva ao tratamento de sincronização com E2, reduzindo a liberação de LH. Estudos conduzidos por Kadokawa et al., (2008) e Redmond et al., (2011) demonstraram aumento na pulsatilidade de LH após o tratamento com Kp em novilhas e ovelhas pré-púberes. Desta forma, o tratamento com Kp poderia induzir o pico de LH e a ovulação após o protocolo de IATF, no sentido de minimizar o efeito negativo do E2 no hipotálamo. O presente estudo objetiva avaliar a resposta folicular e taxa de prenhez de novilhas

Nelore pré-púberes tratadas com Kiss (Kp) ou GnRH no momento da IATF, com a finalidade de aumentar a eficiência reprodutiva dessa biotecnologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância e utilização dos protocolos de IATF

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva que têm sido aplicada com muito sucesso nas propriedades rurais. Por meio da IA é possível melhorar a genética do rebanho pela utilização de touros testados e provados como melhoradores. Entretanto, quando programas de IA são aplicados com base na detecção de estro, é importante salientar que a adoção dessa estratégia pode resultar em resultados insatisfatórios devido às falhas na detecção de estro (ROELOFS et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2013) e do anestro exacerbado em vacas e em novilhas pré-púberes (BÓ et al., 2007). Essas particularidades são agravadas quando se trabalha com rebanhos *Bos indicus* que possuem maior proporção de animais pré-púberes ao sobreano (ABEYGUNAWARDENA; DEMATAWEWA, 2004; NOGUEIRA, 2004; CLARO JÚNIOR et al., 2010) e também estro de menor duração quando comparado com fêmeas *Bos taurus* (PINHEIRO et al., 1998; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; MIZUTA, 2003).

A sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular pode ser realizada pela indução da ovulação do folículo dominante presente no ovário no momento do tratamento (para isso se utiliza GnRH, LH ou hCG) ou por indução de atresia folicular (associação entre P4 e E2). Sendo assim, para evitar problemas da IA com base na detecção de estro, foi desenvolvido na década de 90 o primeiro protocolo hormonal que possibilitou a IA em todas as fêmeas tratadas em tempo pré-determinado, denominado “Ovsynch” (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Este protocolo consiste no tratamento das vacas com GnRH, após 7 dias os animais devem ser tratados com PGF e 48h após a PGF, um novo tratamento com GnRH e a IA programada deve ser realizada 16 horas após o segundo tratamento de GnRH (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). A partir deste avanço, diversos protocolos foram desenvolvidos para controle das funções folicular e luteínica (WILTBANK et al., 2011; BARUSELLI et al., 2012b, 2018; WILTBANK; PURSLEY, 2014) o que permite a aplicação da IATF em larga escala, possibilitando maior taxa de prenhez (número de fêmeas prenhes/ número de fêmeas aptas à reprodução (BARUSELLI et al., 2018). Entretanto, quando o “Ovsynch” foi utilizado em rebanhos zebuínos tropicais, observou-se baixa taxa de prenhez quando comparado à protocolos à base de E2 e

P4 (BARUSELLI et al., 2004). Isto pode estar relacionado à alta incidência de anestro (pré-púbere ou pós-parto) levando a baixa eficiência na indução da ovulação após o primeiro tratamento com GnRH por não haver um folículo responsivo (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Desta forma, os protocolos de sincronização para IATF que utilizam GnRH para controle da emergência de uma nova onda folicular ou indução da ovulação são pouco utilizados no Brasil (FERREIRA et al., 2015).

Nos protocolos de sincronização para IATF que associam o tratamento com E2 e P4 o objetivo é causar a atresia dos folículos antrais. Existem três tipos de ésteres de E2: o benzoato (BE), o valerato (VE) e o cipionato (CE; BÓ et al., 1995). O BE e o VE se diferenciam entre si pelo período de meia vida. Conforme a duração do E2 na corrente sanguínea, ocorre diferenças no momento da emergência da nova onda folicular (SÁ FILHO et al., 2011a). Após o tratamento com BE e P4 ocorre a emergência de uma nova onda folicular de 3 a 4 dias com BE e 4 a 6 com VE (SÁ FILHO et al., 2011a). O desvio folicular ocorre após 2,5 dias em bovinos (GIMENES et al., 2008). O período de permanência da fonte de P4 pode variar de acordo com o protocolo de sincronização e, geralmente a permanência do dispositivo de P4 é de 7 a 9 dias. No momento da retirada do dispositivo (entre 7 e 9 dias) a fêmea recebe o tratamento de CE sincronização da ovulação sincronizada (SALES et al., 2012; TORRES-JÚNIOR et al., 2014) e preparação uterina (SÁ FILHO et al., 2011b, 2017). Utiliza-se também um análogo da Prostaglandina F2 α (PGF) para controle da fase luteínica e diminuição dos níveis de P4 em animais ciclando. Além desses tratamentos, utiliza-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG) para promover o crescimento e maturação do folículo dominante em animais em anestro (SÁ FILHO et al., 2009, 2010a; SALES et al., 2011). Existem, variações dos protocolos de sincronização de emergência de onda de crescimento folicular e da ovulação possibilitando que tratamentos específicos sejam direcionados para diferentes categorias de animais, de acordo com suas particularidades, bem como o uso racional da mão-de-obra, promovendo um manejo eficiente tanto do ponto de vista reprodutivo quanto de logística na fazenda.

2.2. Importância da idade à puberdade para a pecuária de corte

A idade em que a novilha atinge a puberdade está diretamente relacionada a idade ao primeiro parto, que afeta diretamente a vida produtiva da vaca (LESMEISTER; BURFENING; BLACKWELL, 1973; PERRY; CUSHMAN, 2013; PERRY, 2016). Admite-se que a puberdade precoce em novilhas *Bos indicus* pode ser atingida aos 14 meses de idade (ELER; FERRAZ; TEIXEIRA, 2010). Do ponto de vista prático, quanto antes a novilha atinge capacidade de conceber uma gestação, a produção de bezerro será antecipada. Ou seja, se a idade ao primeiro parto for reduzida de três para dois anos de idade, pode haver um incremento no retorno econômico do sistema de produção em até 16% (ELER; FERRAZ; TEIXEIRA, 2010). Outros estudos demonstraram ganhos econômicos de 30% para redução da idade à primeira concepção de 36 meses (frequentemente verificada nos rebanhos brasileiros) para 14 meses (BARUSELLI et al., 2017). Devido ao fato de que, ao se reduzir a idade ao primeiro parto em um ano, também se diminui em um ano a fase de recria (o que reduz uma categoria animal na fazenda) e pode aumentar de 0,5 a 0,8 bezerros por vaca durante toda sua vida reprodutiva (ELER; FERRAZ; TEIXEIRA, 2010). Além de que, ao antecipar a concepção durante a estação reprodutiva, novilhas que concebem no início da primeira estação de monta apresentam o primeiro parto ao redor de 24 meses de idade, possuem maior probabilidade de conceber quando primíparas. Ainda, apresentam partos no início das estações de parições e maior peso à desmama de seus bezerros (LESMEISTER; BURFENING; BLACKWELL, 1973; JOHNSON; FUNSTON, 2013).

Após uma estação de monta em que foi avaliada a probabilidade de prenhez de novilhas Nelore com idade entre 17 e 18 meses (SILVA; DIAS; ALBUQUERQUE, 2005). As novilhas foram expostas à monta natural por touros e foi encontrada alta herdabilidade (0,50) para a característica de precocidade sexual e taxa de prenhez ao final da estação de monta foi semente de 20,6%. Os primeiros relatos da literatura que envolveram o acasalamento de novilhas Nelore de 14 meses à monta natural, obtiveram taxa de prenhez média de 17% (ELER et al., 2002, 2004; SILVA et al., 2003). Com o advento da IATF, é possível obter satisfatória taxa de prenhez em animais em anestro (BARUSELLI et al., 2004). Em estudo recente conduzido por Freitas, (2015) o autor observou taxa de prenhez média à IATF de 35,7% (taxa de prenhez mínima = 16,0% e máxima = 54,5%). Ainda, é possível obter mais de 70% de

taxa de prenhez ao final da estação de monta utilizando programas de ressincronização (COLLI et al., 2017).

Entretanto, o início da vida reprodutiva de novilhas Nelore aos 14 meses de idade ainda é uma realidade observada em poucas propriedades. No Brasil, as fazendas que aplicam este tipo de tecnologia devem focar principalmente na seleção genética para precocidade sexual, além de boas condições nutricionais durante a fase pré e pós desmama para as novilhas (FERRAZ-JÚNIOR et al., 2014). Nos próximos tópicos serão abordados os principais fatores que regulam e estratégias utilizadas para se reduzir a idade à puberdade.

2.3. Mecanismos fisiológicos da puberdade e maturidade sexual

O conceito de início da puberdade pode ser definido como a primeira demonstração de estro, seguido de ovulação, com fase luteínica de duração normal para que a novilha tenha possibilidade de conceber e desenvolver a gestação (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013; PERRY, 2016). O principal fator limitante para o início da puberdade está relacionado na falha hipotalâmica em secretar quantidades suficientes de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), para que ocorra a liberação das gonadotrofinas como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH; DAY et al., 1984). No período de transição entre a pré-puberdade e puberdade ocorre gradativa redução da sensibilidade negativa hipotalâmica ao estradiol (E2; por meio da redução dos receptores de E2 no hipotálamo), que aumenta a secreção de LH (estimula o crescimento folicular nos ovários) estimulando o crescimento de folículos dominantes que aumentam da secreção de E2 e, conseqüentemente, estimulam maior desenvolvimento uterino (DAY et al., 1987; DAY; ANDERSON, 1998). A ausência no padrão de liberação em quantidades suficientes de gonadotrofinas pode influenciar no ambiente intrafolicular e interferir de forma negativa para a qualidade oocitária (WARZYCH et al., 2017).

Um estudo com camundongos “*knockout*” indicou que o receptor de estrógeno do tipo α (ER α) é o primeiro mediador da sinalização do E2 para a liberação episódica de gonadotrofinas (STORMSHAK; BISHOP, 2008). Sabe-se que os neurônios responsáveis pela liberação do GnRH não possuem ER α (LEHMANN; KARSCH, 1993) e progesterona (P4; SKINNER; CARATY; ALLINGHAM, 2001). Estes esteroides

são responsáveis pelos mecanismos de “*feedbacks*” negativo/positivo para regulação da secreção de gonadotrofinas (Tabela 1). Desta forma, os neurônios secretores de Kp têm sido caracterizados como um dos principais componentes da via celular em que o E2 regula a secreção de GnRH (AMSTALDEN et al., 2014). Há também a expressão de Kp e seu receptor (KISS1r) nos gonadotrofos (SMITH et al., 2008b) que atuam de forma sinérgica com o E2 e GnRH para secretar LH (RICHARD et al., 2009). Isto indica que a Kp pode atuar de forma endócrina, parácrina e/ou autócrina como mediador da liberação de gonadotrofinas (GAHETE et al., 2016). Foi observada a resposta na liberação de gonadotrofinas de células hipofisárias em estudos *in-vitro* (EZZAT-AHMED et al., 2010), entretanto, os estudos *in-vivo* não foram capazes de mostrar os mesmos achados (SMITH et al., 2008b).

Durante o período de ciclicidade sazonal de ovelhas há um alto nível de expressão de Kp no hipotálamo além de maior aposição e aumento do estímulo dos terminais dos neurônios de Kp com os neurônios de GnRH (SMITH et al., 2008a). Isto indica que a habilidade da Kp em estimular a liberação de LH em situações de imaturidade sexual pode estar relacionada em superar as deficiências no padrão de liberação de LH em fêmeas pré-púberes (REDMOND et al., 2011).

Tabela 1. Alterações endócrinas durante a pré e peri-puberdade para a puberdade em novilhas.

Variável	Pré-púbere	Peri-púbere	Peri-púbere	Púbere
Quantidade de ER α hipotálamo	Alto	Médio	Baixo	Variado
Feedback do E2 no LH	Altamente negativo	Menos negativo	Menos negativo	Positivo
Secreção de LH	Frequência baixa	Frequência aumentando	Frequência aumentada	↑ da frequência de LH
Concentração de E2	Baixa	Baixa	Média	Alta
Concentração de Kisspeptina	Baixa	Baixa	Média	Alta
Sensibilidade do GnRH a Kp	Baixa	Baixa	Média	Alta

FONTE: Traduzido e adaptado de ATKINS; POHLER; SMITH (2013).

2.4. Nutrição, metabolismo, puberdade e suas interações

A nutrição é de suma importância para garantir a homeostase metabólica, assim como, regula a proporção corporal de tecido adiposo e muscular. Hormônios metabólicos provenientes do tecido hepático (IGF-1), gástrico (Ghrelina) e adiposo (leptina) interagem entre si para controlar as funções reprodutivas (TENA-SEMPERE, 2006b; ROA; TENA-SEMPERE, 2010; KAWWASS; SUMMER; KALLEN, 2015). Novilhas da raça Brahman pré-púberes ($11,0 \pm 0,3$ meses de idade) submetidas à melhores condições nutricionais apresentaram elevadas concentrações de IGF-1 e leptina, assim como, maior ECC quando comparadas às novilhas submetidas à dieta de menor qualidade (SAMADI et al., 2014). Em vacas Nelore, foi observada correlação positiva entre o ECC e a espessura de gordura subcutânea (AYRES et al., 2009). Existem estudos que demonstram a relação das reservas energéticas com a fertilidade em vacas (AYRES et al., 2014) e novilhas Nelore (FREITAS, 2015). Desta forma, animais submetidos à melhores condições nutricionais apresentam maiores níveis de IGF-1 e leptina (SAMADI et al., 2014). Consequentemente, atingem a puberdade precocemente (CARDOSO et al., 2014b; SAMADI et al., 2014).

A leptina é um hormônio proteico sintetizado pelos adipócitos e é considerada um fator endócrino que sinaliza o estado fisiológico de acordo com o status nutricional do animal (HAUSMAN; BARB; LENTS, 2012). Uma de suas principais funções é agir como um sinalizador periférico para o hipotálamo sobre o status nutricional do animal (GAMBA; PRALONG, 2006). O tratamento com leptina recombinante ovina aumentou as concentrações de LH em vacas ovariectomizadas sob regime de restrição alimentar (AMSTALDEN et al., 2002). Entretanto, o tratamento com leptina em animais sob bom regime nutricional se mostrou limitado (AMSTALDEN et al., 2005). Acredita-se que a leptina regula a função reprodutiva por meio de adipocininas que agem nos neurônios secretores de Kp. Haja vista que os neurônios secretores de GnRH também não expressam o receptor para a Leptina (FINN et al., 1998) o que sugere uma ação interneural da regulação da liberação de GnRH pela leptina por meio dos interneurônios POMC e NPY (AMSTALDEN et al., 2014; D'OCCHIO; BARUSELLI; CAMPANILE, 2019; Figura 1).

Figura 1. Figura esquemática do modelo de mudanças do metabolismo no controle e secreção de LH.

FONTE: Adaptado e tradução de AMSTALDEN et al. (2014) e D'OCCHIO; BARUSELLI; CAMPANILE, (2019).

2.5. Síntese e mecanismo de ação da Kisspeptina

O gene *Kiss1* codifica as kisspeptinas, que são de uma família de neuropeptídeos e se originam principalmente de duas populações de células hipotalâmicas (neurônios kisspeptinérgicos; CARATY et al., 2012). Esses neurônios (secretores de kisspeptina) estão localizados principalmente em duas regiões do hipotálamo: no núcleo antero-ventral peri-ventricular (AVPV; roedores)/ área pré-óptica (POA; demais espécies), além da região do núcleo arqueado (ARC; roedores e demais espécies; UENOYAMA et al., 2016). A Kp, inicialmente sintetizada como um peptídeo que contém 154 aminoácidos (conhecido como Prepro-Kisspeptina), é clivada por meio de uma reação proteolítica em 54-aminoácidos (Kp-54) e, a partir da Kp-54, é degradada em uma de três formas peptídicas (Kp-14, Kisspeptina-13 ou Kp-10; KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001; Figura 2).

Figura 2. Características estruturais das kisspeptinas, produto do gene *Kiss1*. Diferentes kisspeptinas são geradas pela clivagem proteolítica (denotadas por x) de um precursor comum. A Prepro-Kisspeptina é uma proteína que contém 154 aminoácidos, uma região sinal com 19 aminoácidos e uma

região central de 54 aminoácidos, a Kisspeptina-54. Formas de baixo peso molecular incluem a Kp-14, Kp-13 e Kp-10. Todas as kisspeptinas são capazes de se ligar e ativar o Kiss1r.

FONTE: Adaptado de TENA-SEMPERE (2006) e ROA et al. (2008).

Todas as formas de kisspeptinas compartilham da mesma amidação no terminal C, permitindo sua ação celular que é caracterizada pela ligação e ativação do receptor acoplado à proteína-G (GPR-54; KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001). O GPR-54 também conhecido como receptor Kiss1 (Kiss1r; SMITH, 2012), e amplamente expresso nos neurônios secretores de GnRH de roedores (IRWIG et al., 2004), suínos (TOMIKAWA et al., 2010) e ovinos (SMITH et al., 2011).

A ligação da Kp com seu receptor Kiss1r se dá pelo acoplamento a uma proteína $G\alpha_{q/11}$ -mediada que após a sua ligação para via de sinalização, inicia a ativação da proteína ativada fosfolipase C ($PLC\beta$). A ativação da $PLC\beta$ inicia a síntese de mensageiros secundários intracelulares, como o inositol trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG); essas moléculas sinalizadoras mediam a liberação de Ca^{2+} e a ativação da proteína quinase C, respectivamente. Acredita-se que a capacidade da Kp estimular a liberação de GnRH está relacionada à ativação dos canais do potencial receptor semelhante transiente canônico (TRPC) e inibição por meio da internalização dos canais de potássio, provavelmente mediado pelo DAG e/ou Ca^{2+} . A Kiss endógena pode ativar o Kiss1r por uma via em que ocorre a ligação à membrana e é seguida da difusão lateral do receptor (revisado por OAKLEY et al., 2009). Desta forma, a Kp tem sido considerada como o maior regulador do eixo gonadotrófico (CARATY et al., 2012; PINILLA et al., 2012). Entretanto, estudos ainda são

necessários no objetivo de entender melhor sobre a ligação do Kiss1r e as proteínas G para melhor compreensão do mecanismo exato do estímulo nas células neuronais secretoras de GnRH (PINILLA et al., 2012).

2.6. A Kisspeptina como reguladora da reprodução e da puberdade

A função da Kp para desencadear a maturidade sexual foi relatada pela primeira vez em 2003 em estudos em roedores e humanos. Nesta ocasião, foi demonstrada que a mutação ou deleção do Kiss1r retardou a puberdade, resultando em infertilidade (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). A administração exógena de Kp ativa o eixo gonadotrófico em roedores e primatas (CLARKSON et al., 2010). Foi observado que após administração central de Kp aumentou-se o nível de LH e proporcionou a abertura vaginal por aproximadamente quatro dias em roedores (NAVARRO et al., 2004). Em primatas o tratamento com Kp em machos pré-púberes proporcionou secreção de GnRH/LH no mesmo padrão dos animais adultos (PLANT; RAMASWAMY; DIPIETRO, 2006). Também, foi observada resposta após o tratamento com Kp na liberação de LH em ovelhas adultas (MESSAGER et al., 2005), vacas taurinas adultas (NANIWA et al., 2013; LEONARDI et al., 2018), novilhas cíclicas (LEONARDI et al., 2018), novilhas Nelore ovariectomizadas (MACEDO et al., 2013), novilhas Holandesas e Gir pré-púberes (KADOKAWA et al., 2008; MACEDO et al., 2019), ovelhas adultas durante anestro sazonal (CARATY et al., 2007), ovelhas pré-púberes (REDMOND et al., 2011) e em búfalas durante a estação reprodutiva favorável e desfavorável (MACEDO et al., 2014). Da mesma forma, que existem relatos da indução da ovulação em ovinos (CARATY et al., 2007; REDMOND et al., 2011) e em bovinos (MACEDO et al., 2013; NANIWA et al., 2013). Diante do exposto, sugere-se o uso da Kp para controle e manipulação da ovulação em animais domésticos, principalmente novilhas Nelore pré-púberes submetidas à programas de IATF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos de manejo e de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo 6254090218.

Manipulação e administração da Kisspeptina

No presente estudo foi utilizada a Kisspeptina-10 murina (Tirosina – Asparagina – Triptofano – Asparagina – Serina – Fenilalanina – Glicina – Leucina – Arginina – Tirosina – NH₂) com amidação no terminal carboxila e pureza > 95% foi fornecida pela companhia farmacêutica Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil – que possui patente em conjunto com a Universidade de São Paulo (Pub. Nº US 2016/0074320 A1) para o uso deste composto (NETO; MACEDO; BARUSELLI, 2016). A dose de 10µg / kg de peso vivo foi escolhida a partir de estudos prévios conduzidos por Macedo et al. (2013, 2014), com maior resposta na secreção de LH em novilhas pré-púberes. Devido a possível instabilidade do princípio ativo, o mesmo foi liofilizado e armazenado em refrigeração a 5º C. Imediatamente antes do tratamento, utilizou-se solução fisiológica para a diluição e administração de 3,0mg por animal (diluídos em 2 mL). E, para a diluição, foram homogeneizados a solução fisiológica + princípio ativo em movimento suaves e após a diluição, o produto se manteve refrigerado e protegido da luz solar.

3.1. Experimento 1 – Resposta folicular e taxa de ovulação

3.1.1. Objetivos

Avaliar o diâmetro do folículo ovulatório, a taxa de ovulação e a dispersão das ovulações de novilhas Nelore submetidas aos diferentes tratamentos (Controle, Kp/Kiss ou GnRH) administrados 48 horas após a remoção do implante auricular de P4.

3.1.2. Hipóteses

Os tratamentos com Kiss ou GnRH proporcionam:

- **aumento** na taxa de ovulação
- **melhora** na sincronia da ovulação (Figura 3);

Figura 3. Desenho do modelo hipotético do Experimento 1 para avaliar a resposta ovariana e dinâmica da dispersão da ovulação.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

3.1.3. Animais e Manejo

O presente estudo foi conduzido em uma fazenda comercial, localizada no município de Ribas do Rio Pardo, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Das 42 novilhas inicialmente sincronizadas para serem utilizadas no presente experimento, 12 (23,1%) não responderam ao protocolo de sincronização da emergência de uma nova onda folicular (ausência de folículo dominante ≥ 6 mm no momento da retirada do implante de P4) e foram removidas do estudo. Para tal, foram utilizadas 30 novilhas com idade entre 12 a 16 meses, média de 14.5 ± 0.8 meses de idade e escore de condição corporal (ECC) 3.1 ± 0.4 (escala de 1 = emaciada a 5 = obesa; AYRES et al., 2009). Durante do período experimental, as novilhas foram mantidas em pastagens formadas por *Brachiaria decumbens* com livre acesso à água e sal mineral.

3.1.4. Protocolo hormonal para sincronização e tratamentos

No primeiro dia do protocolo (D0) de sincronização da ovulação, as novilhas receberam o tratamento de 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ferticare Sincronização®, Vallée, São Paulo, Brasil) associado com a inserção de um implante auricular que contém 3,0 mg de norgestomet (P4; Crestar®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Oito dias após, no D8, o implante foi removido e concomitantemente as novilhas foram tratadas com 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD Saúde Animal), 0,265 mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF; Ciosin®, MSD Saúde Animal), mais o tratamento de 0,5 mg de cipionato de estradiol (CE; Ferticare Ovulação®, Vallée). Após 48 horas da remoção do implante auricular, no D10, as novilhas foram homogeneamente distribuídas em três grupos: Grupo Controle, N=10, as novilhas não receberam tratamento adicional; Grupo Kiss, N=10, as novilhas foram tratadas com 3,0 mg i.m. de Kisspeptina e; Grupo GnRH, N=10, as novilhas foram tratadas com 0,01 mg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ouro Fino Saúde Animal; Figura 4).

3.1.5. Expressão de estro

No momento da remoção do implante auricular de P4, as novilhas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Bastão Marcador de Cera Walmur, Porto Alegre, Brasil). A ocorrência de estro foi considerada quando as novilhas não apresentavam a base da cauda marcada 48 horas após a remoção do implante auricular de P4.

3.1.6. Avaliações ultrassonográficas

Exames ultrassonográficos dos ovários foram realizados utilizando transdutor linear na frequência de 8,0 MHz (M5vet – Mindray, Biomedical Electronics Co, Shenzhen, Guangdong, China). Para a avaliação da ciclicidade das novilhas, foram realizadas avaliações no D-10 e no D0 e foram selecionadas apenas novilhas que não possuíssem corpo-lúteo (CL) em um dos ovários. No D8 (0h), D9 (24h), D10 (48h),

D10 (60h), D11 (72h), D11 (84h) foram realizadas avaliações ultrassonográficas para a mensurar o diâmetro do maior folículo (MF) e determinação do momento da ovulação. A ovulação foi definida como o momento do desaparecimento do maior folículo (previamente identificado) entre duas avaliações (12h de intervalo). A ovulação foi considerada ter ocorrido quando o MF da avaliação anterior não estava mais presente, como descrito por Sales et al. (2012) e confirmada na presença de um CL no ovário ipsilateral ao do MF (Figura 4).

3.1.7. Análises Estatísticas

Informações de cada novilha foram compiladas em uma planilha para análise estatística. Os dados foram analisados com o auxílio dos procedimentos do SAS (Statistical Analysis System Inst. Inc., Cary, NC). As variáveis contínuas foram testadas de acordo com sua normalidade dos resíduos utilizando-se o PROC UNIVARIATE. As variáveis que não obtiveram a normalidade foram transformadas e “outliers” foram removidos quando necessário.

No modelo estatístico foram inclusas as variáveis de tratamento e expressão de estro, assim como suas interações. As variáveis resposta analisadas foram o diâmetro do MF no momento da retirada do implante de P4, o diâmetro do MF 24 horas e a partir de 48 horas após a remoção do implante de P4 o diâmetro do MF a cada 12 horas de intervalo até as 84 horas após a remoção do implante de P4. Para análises pontuais do tamanho do MF foi utilizado o PROC GLIMMIX do SAS. Para a determinação do momento da ovulação foram utilizados o PROC GLM e o teste de Bartlett.

As variáveis contínuas como o diâmetro do maior folículo, são mostradas em milímetros, momento da ovulação em horas após a remoção do implante de P4, os resultados estão mostrados como média $\pm$ erro padrão. A taxa de ovulação está mostrada como porcentagem (%). Foi considerado como diferença significativa valor de $P < 0,05$.

Figura 4. Esquema do delineamento experimental para avaliar dinâmica da dispersão e do momento da ovulação. Foi realizado um protocolo à base de P4/E2. No primeiro dia (D0) foi inserido um implante auricular contendo 3mg de Norgestomet (P4) associado ao tratamento de 1mg de benzoato de estradiol (BE), oito dias após o implante foi removido e as novilhas foram tratadas com 0,5mg de cipionato de estradiol, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,265mg de cloprostenol sódico (PGF). No D10, 48h após a remoção o implante de P4 as novilhas foram submetidas à receberem um de três tratamentos, Grupo Controle, N = 10, Grupo Kiss, N = 10 e Grupo GnRH, N = 10. Exames ultrassonográficos no D-10 e D0 para avaliação da ciclicidade. Ultrassonografia no D8 (0h), D9 (24h) após a remoção do implante de P4, D10 (48h e 60h após a remoção do implante de P4) e no D11 (72h e 84h após a remoção do implante de P4). Ultrassonografia no D17 para confirmação da ovulação.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

3.2. Experimento 2 – Taxa de ovulação e prenhez

3.2.1. Objetivos

Avaliar em novilhas Nelore submetidas aos diferentes tratamentos (Controle, Kiss ou GnRH) administrados 48 horas após a remoção do implante auricular de P4:

- a taxa de ovulação após o tratamento;
- o diâmetro do CL no diestro subsequente ao tratamento;
- a taxa de prenhez 30 dias após a IATF;
- o tamanho (mm) do embrião no momento do diagnóstico de gestação (30 dias);
- a taxa de prenhez 60 dias após a IATF;
- a perda gestacional entre 30 e 60 dias após a IATF.

3.2.2. Hipóteses

Os tratamentos com Kiss ou GnRH proporcionam:

- **aumento** da taxa de ovulação;
- **aumento** do diâmetro do corpo lúteo sete dias após o tratamento;
- **aumento** da taxa de prenhez;
- **aumento** do tamanho (mm) do embrião;
- **diminuição** da taxa de perda gestacional (Figura 5).

Figura 5. Desenho do modelo hipotético do Experimento 2 para avaliar a taxa de ovulação e taxa de prenhez.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

3.2.3. Animais e Manejo

O estudo foi conduzido em uma fazenda comercial localizada no município de Camapuã, no estado do Mato Grosso do Sul. De 634 novilhas da raça Nelore sincronizadas com idade entre 12 a 15 meses, foram utilizadas apenas 592 provenientes de seis lotes (pastos/ piquetes) diferentes. Foram excluídas da análise final 42 animais devido ao fato de: perda do implante auricular, N = 5; possuir um corpo lúteo em uma das duas avaliações ultrassonográficas no D0 ou D8, N = 12 e

que a ovulação ocorreu entre a retirada do implante auricular e a IATF (D8 e D10) e ter um CL no dia 17 no ovário ipsilateral ao que o maior folículo estava presente no D8, N = 25. Para a análise final, foram avaliados dados de somente 592 novilhas com média de idade de $14,4 \pm 0,9$ meses de idade. As novilhas foram classificadas no D0 de acordo com o ECC de média $3,3 \pm 0,3$, considerou-se escala de 1 = emaciada a 5 = obesa; de acordo com Ayres et al. (2009). E peso vivo de $272,7 \pm 20,2$ kg. Ao longo do período experimental as novilhas foram mantidas em pastagens formadas por *Brachiaria brizantha* com acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Suplementação energética (milho moído) e proteica (Lambisk S®, Trouw Nutrition, Campinas, Brasil) na proporção de 30% de Lambisk S® e 70% de milho moído que foi fornecido 400mg / kg de peso vivo / animal / dia para atingir ou manter os requerimentos nutricionais mínimos (NRC, 2016).

3.2.4. Protocolo hormonal e tratamentos

No primeiro dia do protocolo (D0) de sincronização da ovulação, as novilhas receberam o tratamento de 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ferticare Sincronização®, Vallée, São Paulo, Brasil) associado com a inserção de um implante auricular que contém 3,0 mg de norgestomet (P4; Crestar®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Oito dias após, no D8, o implante foi removido e concomitantemente as novilhas foram tratadas com 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD Saúde Animal), 0,265 mg i.m. de cloprostenol sódico (PGF; Ciosin®, MSD Saúde Animal), mais o tratamento de 0,5 mg de cipionato de estradiol (CE; Ferticare Ovulação®, Vallée). Após 48 horas da remoção do implante auricular, no D10, as novilhas foram homogeneamente distribuídas em três grupos: Grupo Controle, N=200, as novilhas não receberam tratamento adicional; Grupo Kiss, N=198, as novilhas foram tratadas com 3,0 mg i.m. de Kisspeptina e; Grupo GnRH, N=194, as novilhas foram tratadas com 0.01mg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ouro Fino Saúde Animal) no mesmo momento dos tratamentos, no D10, foi realizada a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) nas novilhas. Sêmen proveniente de três touros com fertilidade conhecida foram utilizados e a IATF foi realizada por dois inseminadores experientes equilibrados homogeneamente entre os três grupos de tratamento (Figura 6).

3.2.5. *Expressão de estro*

No momento da remoção no implante auricular de P4, as novilhas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Bastão Marcador de Cera Walmur, Porto Alegre, Brasil). O estro foi considerado quando as novilhas não apresentavam a base da cauda marcada no momento da IATF, 48 horas após a remoção do implante auricular de P4.

3.2.6. *Avaliações ultrassonográficas*

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas com transdutor linear ajustado na frequência de 7.5 MHz (DP2200vet - Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, Guangdong, China). No D0, as novilhas foram avaliadas para determinação do escore de trato reprodutivo (ETR) e classificadas de 1 a 5 (HOLM; THOMPSON; IRONS, 2009). Nos momentos D-10 e D0 avaliações ultrassonográficas foram realizadas para determinar o status puberal. Foi considerada como pré-púbere a novilha que não possuía um CL em um dos ovários em nenhuma das avaliações. No D8 e no D10 (48h após a remoção do implante auricular) foi mensurado o diâmetro (mm) do maior folículo (MF) em um dos dois ovários. No D17 foi avaliada a taxa de ovulação (n° de novilhas com CL / n° de novilhas inseminadas). No D40, 30 dias após a IATF, foi realizado exame ultrassonográfico para determinar a taxa de prenhez à IATF (P/IA) por meio da visualização da vesícula embrionária com um embrião viável com base na detecção de batimento cardíaco (YOUNGQUIST, 2007; n° de novilhas prenhes / número de novilhas sincronizadas). No D70, as novilhas consideradas gestantes no D40 foram reexaminadas por ultrassonografia para o diagnóstico de confirmação da gestação e cálculo da perda gestacional entre o D40 e o D70 (n° de novilhas com perda gestacional / n° de novilhas prenhes no D30; Figura 6).

3.2.7. Análise Estatística

Informações de cada novilha foram compiladas em uma planilha para análise estatística. Os dados foram analisados com o auxílio dos procedimentos do SAS (Statistical Analysis System Inst. Inc., Cary, NC). As variáveis contínuas foram testadas de acordo com a normalidade dos resíduos utilizando-se o PROC UNIVARIATE e as variáveis que não obtiveram a normalidade foram transformadas e “outliers” foram removidos.

No modelo estatístico foram inclusas variáveis fixas de lote, touro e inseminador. Assim como inclusas co-variáveis como: peso, ECC e idade. As variáveis resposta analisadas foram o diâmetro do MF no momento da retirada do implante de P4 (D8), o diâmetro do MF 48 horas após a remoção do implante de P4 (no momento da IATF, no D10), taxa de ocorrência de estro entre o D8 e D10, P/IA 30 dias e P/IA 60 após a IATF, assim como a taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias após a IATF, assim como suas interações. Foi utilizado o modelo “*backward regression*”, e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas de acordo com o critério de Wald se $P > 0,20$ e o modelo final foi escolhido o de menor valor de acordo com o critério de AICC (*Akaike information criterion – corrected version*). Estas análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do PROC GLIMMIX do SAS. Os dados para a taxa de ovulação também foram analisados por contraste ortogonal, C1 para avaliar o efeito do tratamento com os indutores de ovulação (Grupo Controle vs. Grupo Kp + Grupo GnRH) e C2 para avaliar o efeito do tipo de indutor de ovulação (Grupo Kp vs. Grupo GnRH). Foram criados pontos de corte acima e abaixo da média para determinar as classes das variáveis idade, peso, ECC e ETR.

Para as variáveis contínuas como o diâmetro do MF no D8 e D10 e diâmetro do CL no D17 (expressas em milímetros) os resultados foram mostrados como média $\pm$ erro padrão. E as variáveis binomiais como a taxa de ocorrência de estro, taxa de ovulação, P/IA aos 30 dias, P/IA aos 60 dias e perda gestacional entre 30 e 60 dias foram mostradas como porcentagem (%).

Foi considerado como diferença significativa se o valor de $P < 0,05$ e tendência quando $P < 0,10$.

Figura 6. Delineamento experimental para avaliação da taxa de ovulação e taxa de prenhez. Foi realizado um protocolo à base de P4/E2. No primeiro dia (D0) foi inserido um implante auricular contendo 3,0 mg de Norgestomet (P4) associado ao tratamento de 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE), oito dias após o implante foi removido e as novilhas foram tratadas com 0,5mg de cipionato de estradiol, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,265mg de cloprostenol sódico (PGF). No D10, 48h após a remoção o implante de P4 as novilhas foram submetidas à IATF e receberam um de três tratamentos, Grupo Controle, N = 200, Grupo Kiss, N = 198 e Grupo GnRH, N = 194. Exames ultrassonográficos no D-10 e D0 para avaliação da ciclicidade. Ultrassonografia no D8 (0h), D10 (48h após a remoção do implante de P4) para mensuração do maior folículo ($\varnothing$ MF). Ultrassonografia no D17 para confirmação da ovulação (cOvu) e mensuração do CL ($\varnothing$ CL). Ultrassonografia (US) para diagnóstico de gestação aos 30 dias (DG1) e aos 60 dias após a IATF (DG2), no D40 e D70, respectivamente.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

4 RESULTADOS

4.1. Resultados do Experimento 1 - Resposta folicular e taxa de ovulação

As respostas foliculares entre os diferentes grupos (Controle, Kiss e GnRH) estão apresentadas na Tabela 2. Não houve diferença no diâmetro do maior folículo no D8 ($P = 0,65$) e no D10 ($P = 0,85$). Da mesma forma, o intervalo entre a remoção da fonte exógena de P4 e a ovulação não diferiu entre os tratamentos [Controle = $78,9 \pm 9,4$ h; Kiss = $76,5 \pm 8,9$ h e GnRH = $82,5 \pm 11,9$ h; ($P = 0,51$; Tabela 2)]. O intervalo médio da retirada da fonte exógena de P4 e a ovulação foi de $76,6 \pm 10,6$ h.

Tabela 2. Variáveis explanatórias e efeitos dos tratamentos com Kiss e GnRH como indutores de ovulação nas respostas foliculares de novilhas da raça Nelore submetidas à um protocolo de sincronização para IATF à base de P4 e E2.

Variáveis	Grupo			Valor de P
	Controle	Kiss	GnRH	
Nº de animais ^a	10	10	10	-
MF no D8, mm ^b	$8,4 \pm 0,8$	$8,1 \pm 1,6$	$8,5 \pm 1,5$	0,65
MF no D10, mm ^c	$9,2 \pm 1,5$	$8,8 \pm 1,6$	$9,3 \pm 2,5$	0,85
Taxa de ovulação, %, (n/n) ^d	70,0 % (7/10)	80,0 % (8/10)	80,0 % (8/10)	0,83
Intervalo entre a remoção do implante de P4 e a ovulação, h ^e	$78,9 \pm 9,4$	$76,5 \pm 8,9$	$82,5 \pm 11,9$	0,51
Diâmetro do folículo ovulatório, mm ^f	$9,5 \pm 1,3$	$9,9 \pm 0,9$	$10,5 \pm 2,1$	0,51

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

a = número de animais experimentais de cada grupo;

b = diâmetro do maior folículo (MF) no momento da retirada da fonte de P4;

c = diâmetro do maior folículo (MF) 48 horas após a remoção da fonte de P4;

d = intervalo (horas) entre a remoção da fonte de P4 e momento da ovulação;

f = diâmetro máximo recordado do maior folículo (MF) previamente à ovulação.

Não houve diferença na dispersão da ovulação entre os tratamentos (Gráfico 1). Da mesma forma que não houve diferença ($P = 0,51$) no diâmetro do folículo ovulatório entre os grupos experimentais. A ocorrência de estro entre o momento da retirada do implante e o tratamento foi de 63,3% (19/30). Não foi observada interação entre ocorrência de estro*tratamento ($P = 0,58$). Também, não se verificou efeito de estro ($P = 0,30$) no intervalo entre a retirada do implante de P4 e a ovulação (presença de estro, $N = 77,6 \pm 10,5h$ vs. Ausência de estro = $84,0 \pm 7,6 h$).

Gráfico 1. Dispersão da ovulação de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento do D10 do protocolo de sincronização para IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de busarelina).

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

4.2. Resultados do Experimento 2 – Taxa de ovulação, taxa de prenhez e perda gestacional

Na tabela 3 estão descritas as variáveis utilizadas para a homogeneização das novilhas que foram distribuídas entre os grupos experimentais. Não houve diferença significativa ($P > 0,10$) para a idade, peso vivo, ECC, ETR, MF no D8, MF no D10, taxa de crescimento folicular e comportamento de estro entre o D8 e o D10 para as características observadas previamente ao tratamento dos grupos experimentais (Controle, Kiss ou GnRH).

Tabela 3. Variáveis explanatórias de novilhas Nelore previamente ao tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).

Variáveis	Grupo			Valor de P
	Controle	Kiss	GnRH	
Número de animais	200	198	194	-
Idade, meses ^a	14,4 ± 0,9	14,4 ± 0,9	14,4 ± 1,0	0,84
Peso vivo, kg ^b	271,7 ± 18,4	274,5 ± 20,3	271,9 ± 20,9	0,49
ECC, 1 – 5 ^c	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,3	0,82
ETR no D0, 1 - 5 ^d	2,5 ± 0,6	2,4 ± 0,5	2,4 ± 0,6	0,81
MF no D8, mm ^e	9,2 ± 2,0	9,2 ± 1,7	9,0 ± 2,0	0,39
Taxa de crescimento folicular, mm ^f	1,4 ± 1,6	1,5 ± 1,7	1,7 ± 1,6	0,16
MF no D10, mm ^g	10,6 ± 2,1	10,7 ± 1,7	10,7 ± 2,0	0,96
Comportamento de estro entre o D8 e D10, %, n/n ^h	78,0 % (156/200)	79,4 % (158/198)	79,3 % (154/194)	0,70

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

a = A idade em meses foi calculada por meio de informação fornecida pela propriedade;

b = O peso vivo em quilogramas foi avaliado por meio de balança eletrônica;

c = O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado utilizando a escala de 1 a 5, descrito por Ayres et al., (2009);

d = O escore de trato reprodutivo (ETR) foi avaliado utilizando a escala de 1 a 5, descrito por Holm; Thompson; Irons (2009);

e = O diâmetro do maior folículo (MF) no D8 mensurado em mm;

f = Taxa de crescimento do maior folículo, calculado pela diferença da mensuração realizada no D10 e dividido por dois;

g = O diâmetro do maior folículo (MF) no D10 mensurado em mm;

h = O comportamento de estro foi avaliado por meio da avaliação da remoção da marca do bastão marcador

A taxa de ovulação geral após o protocolo de sincronização foi 87,2% (516/592). Não foi encontrado efeito de tratamento nem por regressão logística ($P =$

0,38; Gráfico 2) e nem por contraste ortogonal (C1 Controle vs. Kiss+GnRH = 0,29; C2 Kiss vs. GnRH = 0,40). Também, não houve interação tratamento*lote ($P = 0,96$). Assim como não foram encontradas interações significativas entre tratamento*ECC ($P = 0,83$), tratamento*idade ($P = 0,43$), tratamento*peso (0,30) e tratamento*ETR ($P = 0,12$) para a taxa de ovulação (Tabela 4). Também, não foram encontradas diferenças com relação à taxa de múltipla ovulação e diâmetro do corpo lúteo 7 dias após a IATF (Tabela 8). Entretanto, houve efeito de lote ($P = 0,001$) para taxa de ovulação [lote 1 = 91,5 %^a (97/106), lote 2 = 88,6 %^{a b} (93/105), lote 3 = 87,7 %^{a b} (85/97), lote 4 = 92,5 %^a (86/93), lote 5 = 73,6 %^b e lote 6 = 90,6 %^{a b} (77/85)]. Houve tendência ($P = 0,09$) para maior taxa de ovulação em novilhas classificadas com ETR acima de 3 quando comparadas às novilhas com ETR abaixo de 2 [90.1% (227/252) vs. 85.0% (289/340), respectivamente]. Novilhas que foram tratadas com GnRH apresentaram taxa de ovulação semelhante, independentemente da manifestação de estro. Entretanto, esse resultado não foi verificado nas novilhas do grupo controle e Kiss [Estro Não: Controle = 70,5 %^{b c} (31/33); Kiss = 65,0 %^c (26/40) e; GnRH = 82,5 %^{a b c} (33/40); Estro Sim: Controle = 88,5 %^{a b} (138/156); Kiss = 94,9 %^a (150/158) e; GnRH = 89,6 %^a (138/154); $P = 0,04$; Tabela 7].

Gráfico 2. Taxa de ovulação IATF de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Tabela 4. Efeito das classes de idade, peso, ECC e ETR na taxa de ovulação de novilhas Nelore pré-púberes conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).

Taxa de Ovulação, %, (n/n)					
Variável	Controle	Kiss	GnRH	Valor de P	
Idade				Var	Var*Trat
≤ 14,4m	84,0 % (79/84)	85,4 % (76/89)	84,3 % (75/89)	0,21	0,43
> 14,4m	84,9 % (90/106)	91,7 % (100/109)	91,4 % (96/105)		
Peso					
< 272 kg	79,4 % (85/107)	88,3 % (83/94)	86,4 % (89/103)	0,23	0,30
≥ 272 kg	90,3 % (84/93)	89,4 % (93/104)	90,1 % (82/91)		
ECC					
< 3,5	82,0 % (100/122)	86,9 % (113/130)	86,8 % (99/114)	0,22	0,84
≥ 3,5	88,5 % (69/78)	92,6 % (63/68)	90,0 % (72/80)		
ETR					
≤ 2	83,5 % (91/109)	88,5 % (108/122)	82,6 % (90/109)	0,09	0,12
≥ 3	85,7 % (78/91)	89,5 % (68/71)	95,3 % (81/85)		

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

A P/IA aos 30 dias de gestação foi de 43,2 % (256/592). Não houve diferença significativa para P/IA aos 30 dias entre os tratamentos [Controle 44,5 % (89/200); Kiss 43,4 % (86/198) e GnRH 41,8 % (81/194; $P = 0,77$; Gráfico 3; Tabela 8). Da mesma forma que não houve diferenças para as variáveis lote ($P = 0,13$) e inseminador ($P = 0,70$), nem interações lote*tratamento ($P = 0,41$) e lote*inseminador ($P = 0,41$). Houve efeito de touro para a P/IA aos 30 dias [touro A = 51,8% (101/195)^a; touro B = 42,4% (83/196)^b; touro C = 35,6% (72/201)^b], porém não houve interação touro*tratamento ($P = 0,23$). Não foram encontradas interações significativas entre os tratamentos (Controle, Kiss e GnRH) para a P/IA 30 dias após à IATF com as classes de ECC ($P = 0,29$), idade ($P = 0,49$), peso ($P = 0,91$) e ETR ($P = 0,23$; Tabela 5). Contudo foi observada tendência ($P = 0,05$) para a P/IA aos 30 dias de acordo com o ETR (Tabela 5).

O tamanho do embrião no momento do diagnóstico de gestação apresentou efeito de touro ($P = 0,006$) para a medida nuca-sacro (touro A = $10,3 \pm 0,8^{ab}$; touro B = $10,7 \pm 0,8^a$ e touro C = $10,0 \pm 0,9^b$) e tendência ($P = 0,08$) para a medida do tórax

(touro A = $5.9 \pm 1,0$; touro B = $5,7 \pm 0,9$ e touro C = $5,1 \pm 0,8$ mm). Não foram encontradas diferenças no tamanho do embrião com relação aos tratamentos (Tabela 8), e também não se verificou interação entre touro*tratamento (nuca-sacro: $P = 0,97$; torácico: $P = 0,50$) e touro*lote (nuca-sacro: $P = 0,76$; torácico: $P = 0,51$).

Gráfico 3. Taxa de prenhez aos 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o tratamento no momento da IATF (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina).

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Tabela 5. Efeito das classes de idade, peso, ECC e ETR na taxa de prenhez 30 dias após à IATF de novilhas Nelore pré-púberes conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina no momento IATF).

Taxa de Prenhez 30 dias após a IATF, %, (n/n)					
Variável	Controle	Kiss	GnRH	Valor de P	
Idade				Var	Var*Trat
≤ 14,4m	41,5 % (39/94)	37,1 % (33/89)	43,8 % (39/89)	0,65	0,49
> 14,4m	47,2 % (50/106)	48,6 % (53/109)	40,0 % (40/105)		
Peso					
< 272 kg	41,1 % (44/107)	37,2 % (35/94)	37,9 % (39/103)	0,04	0,91
≥ 272 kg	48,4 % (45/93)	49,0 % (51/104)	46,2 % (42/91)		
ECC					
< 3,5	41,0 % (50/122)	38,5% (50/130)	43,0 % (49/114)	0,35	0,29
≥ 3,5	50,0 % (39/78)	52,9 % (36/68)	40,0 % (32/80)		
ETR					
≤ 2	44,0 % (48/109)	40,2 % (49/122)	33,9 % (44/85)	0,05	0,23
≥ 3	45,1 % (41/91)	48,7 % (37/76)	51,8 % (44/85)		

A taxa média de expressão de estro entre o momento da retirada do implante de P4 e a IATF foi de 79,1% (468/592). As novilhas que manifestaram o comportamento de estro apresentaram maior taxa de prenhez quando comparadas às novilhas que não apresentaram comportamento de estro [Estro sim = 46,4% (217/468)^a vs. Estro não = 31,5% (39/124)^b; Gráfico 4; Tabela 6]. Contudo não foi observada interação (P = 0,24) tratamento*estro para a taxa de prenhez, como demonstrada na (Gráfico 5).

Gráfico 4. Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme a expressão de estro entre a retirada da fonte exógena de P4 e a IATF.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Gráfico 5. Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore de 14 meses de acordo com a expressão de estro e conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina recebido no momento da IATF).

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Tabela 6. Respostas foliculares, taxa de prenhez à IATF e perda gestacional de acordo com a ocorrência ou não de estro entre o momento da retirada do implante de P4 e a IATF

Variáveis	Estro ^a		Valor de P
	Não	Sim	
N	124	468	-
MF no D8, mm ^b	8,4 ± 1,8	9,3 ± 1,9	< 0,0001
MF no D10, mm ^c	9,7 ± 1,9	10,9 ± 1,9	< 0,0001
Taxa de ovulação, %, N/N ^d	72,6% (90/124)	91,0% (426/468)	< 0,0001
Diâmetro do CL, mm ^e	13,6 ± 3,8	14,3 ± 3,7	0,08
P/IA 30d, %, N/N ^f	31,5% (39/124)	46,4% (217/468)	0,03
P/IA 60d, %, N/N ^g	29,0% (36/124)	43,2% (202/468)	0,003
Perda gestacional, %, N/N ^h	7.7% (3/39)	6.9% (15/217)	0,98

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

a = O comportamento de estro foi avaliado por meio da avaliação da remoção da marca do bastão marcador;

b = O diâmetro do maior folículo no D8 mensurado em mm;

c = O diâmetro do maior folículo no D10 mensurado em mm;

d = A taxa de ovulação foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas com um ou mais CL no D17 / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

e = O diâmetro do CL foi mensurado em milímetros;

f = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 30 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

g = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 60 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

h = A taxa de perda gestacional foi calculada pela diferença da taxa de prenhez aos 60 dias e 30 dias.

Tabela 7. Efeito da ocorrência do estro e do tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kisspeptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina) no momento da IATF em novilhas pré-púberes da raça Nelore.

Variáveis	Estro Não			Estro Sim ^d			Valor de P		
	Grupos								
	Controle	Kiss	GnRH	Controle	Kiss	GnRH	Estro	Trat	Estro*Trat
N	44	40	40	156	158	154	-	-	-
MF no D8, mm ^e	8,3 ± 1,9	8,7 ± 1,6	8,3 ± 1,9	9,5 ± 2,0	9,3 ± 1,7	9,2 ± 2,0	< 0,0001	0,39	0,43
MF no D10, mm ^f	9,5 ± 1,9	9,9 ± 1,7	9,3 ± 2,0	10,9 ± 2,1	10,9 ± 1,7	10,9 ± 1,9	< 0,0001	0,96	0,34
Taxa de ovulação, %, (n/n) ^g	70,5 % ^{b c} (31/44)	65 % ^c (26/40)	82,5 % ^{a b c} (33/40)	88,5 % ^{a b} (138/156)	94,9 % ^a (150/158)	89,6 % ^a (138/154)	< 0,0001	0,38	0,04
Diâmetro do CL, mm ^h	13,3 ± 3,5	13,1 ± 3,5	14,3 ± 4,3	14,1 ± 3,7	14,2 ± 3,5	14,4 ± 3,8	0,08	0,30	0,53
P/IA 30 d, %, (n/n) ⁱ	34,1 % (15/44)	22,5 % (9/40)	37,5 % (15/40)	47,4 % (74/156)	48,7 % (77/158)	42,9 % (66/154)	0,03	0,77	0,24
P/IA 60 d, %, (n/n) ^j	34,1 % (15/44)	22,5 % (9/40)	30,0 % (12/40)	45,5 % (71/156)	44,9 % (71/158)	39,0 % (60/154)	0,003	0,50	0,63
Perda gestacional, %, (n/n) ^k	0,0 % (0/15)	0,0 % (0/9)	20 % (3/15)	4,1 % (3/74)	7,8 % (6/77)	9,1 % (6/66)	0,98	0,17	0,99

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Diferentes sobrescritos (a, b, c) na mesma linha diferem estatisticamente (P < 0,05);

d = O comportamento de estro foi avaliado por meio da avaliação da remoção da marca do bastão marcador;

e = O diâmetro do maior folículo no D8 mensurado em mm;

f = O diâmetro do maior folículo no D10 mensurado em mm;

g = A taxa de ovulação foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas com um ou mais CL no D17 / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

h = O diâmetro do CL foi mensurado em milímetros;

i = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 30 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

j = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 60 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

k = A taxa de perda gestacional foi calculada pela diferença da taxa de prenhez aos 60 dias e 30 dias.

A média do diâmetro folicular no momento da IATF foi de $10,6 \pm 1,6$ mm. A distribuição das novilhas de acordo com a classe do MF no dia da IATF foi de 51% para folículos classificados como $>10,6$ mm e de 49% para novilhas com folículo classificados como $\leq 10,6$ mm. As novilhas que apresentavam folículo de maior diâmetro no momento da IATF tiveram maior taxa de prenhez do que novilhas com folículo de menor diâmetro (Gráfico 6). Porém não houve interação entre as novilhas categorizadas de acordo como a classe do MF e o tratamento ($P = 0,29$; Gráfico 7).

Gráfico 6. Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o diâmetro do MF no momento da IATF.

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

Gráfico 7. Taxa de prenhez 30 dias após a IATF de novilhas Nelore conforme o diâmetro do MF no momento da IATF e conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina no momento da IATF).

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

A taxa de prenhez à IATF aos 60 dias foi de 40,2% (238/592). Não houve diferenças estatísticas para a taxa de prenhez à IATF aos 60 dias com relação a: lote ($P = 0,13$), tratamento ($P = 0,50$) e suas interações com lote*touro ($P = 0,11$) e tratamento*touro ($P = 0,31$). Entretanto houve efeito de touro para prenhez aos 60 dias [touro A = 49,3% (96/195)^a; touro B = 31,9% (76/196)^{ab} e touro C = 27,7% (66/201)^b; $P = 0,002$]. Não houve efeito de tratamento ($P = 0,17$) e de touro ($P = 0,73$) para perda gestacional, nem interação tratamento*touro ($P = 0,98$).

Tabela 8. Resultados obtidos em novilhas pré-púberes da raça Nelore conforme o tratamento (Controle: sem tratamento adicional; Kiss: 3mg de Kissseptina-10 e; GnRH: 0,01mg acetato de buserelina recebido no momento da IATF^a).

Variáveis	Grupo			Valor de P
	Controle	Kiss	GnRH	
N	200	198	194	-
Taxa de ovulação, %, (n/n) ^b	84,5% (169/200)	88,9% (176/198)	88,1% (171/194)	0,38
Taxa de múltipla ovulação, %, (n/n) ^c	14,2% (24/169)	15,3% (27/176)	17,5% (30/171)	0,52
Diâmetro do CL, mm ^d	14,0 ± 0,4	14,1 ± 0,3	14,8 ± 0,3	0,30
P/IA 30d, %, (n/n) ^e	44,5 % (89/200)	43,4 % (86/198)	41,8 % (81/194)	0,77
P/IA 30 dias das ovuladas, %, (n/n) ^f	52,7 % (89/169)	48,9 % (86/176)	47,4 % (81/171)	0,68
Distância nuca-sacro do embrião, mm ^g	10,3 ± 0,8	10,3 ± 1,0	10,5 ± 0,9	0,64
Largura do tórax do embrião, mm ^h	5,6 ± 0,7	5,6 ± 1,0	5,7 ± 1,1	0,85
P/IA 60d, %, (n/n) ⁱ	43,0 % (86/200)	40,4 % (80/198)	37,1 % (72/194)	0,50
P/IA 60 dias das ovuladas, %, (n/n) ^j	50,8 % (86/169)	45,5 % (80/176)	42,1 % (72/171)	0,32
Perda gestacional, %, (n/n) ^k	3,4 % (3/89)	7,0 % (6/86)	11,1 % (9/81)	0,17

FONTE: COLLI, M. H. A., (2018).

a = Foi realizado um protocolo da sincronização da emergência de uma nova onda folicular e ovulação à base de E2/P4. No D10, 48h após a remoção o implante de P4 as novilhas foram submetidas à IATF e receberam um de três tratamentos, Grupo Controle, N = 200 (sem tratamento adicional), Grupo Kiss, N = 198 (tratamento de 3,0 mg de Kissseptina-10) e Grupo GnRH, N = 194 (tratamento com 0,01mg de acetato de buserelina). Ultrassonografia no D17 para confirmação da ovulação (para avaliar a taxa de ovulação) e mensuração do diâmetro do CL. Ultrassonografia (US) para diagnóstico de gestação aos 30 dias e aos 60 dias após a IATF, no D40 e D70, respectivamente.

b = A taxa de ovulação foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas com um ou mais CL no D17 / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

c = A taxa de múltipla ovulação foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas com dois ou mais CL no D17 / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

d = O diâmetro do CL foi mensurado em milímetros;

e = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 30 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

f = A taxa de prenhez das ovuladas foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 30 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF que ovularam;

g = A distância nuca-sacro do embrião foi considerada a medida longitudinal em milímetros do embrião visualizado no momento do diagnóstico de gestação por ultrassonografia, realizado 30 dias após a IATF;

h = A largura do tórax do embrião foi considerada como a medida transversal em milímetros do embrião visualizado no momento do diagnóstico de gestação por ultrassonografia, realizado 30 dias após a IATF;

i = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 60 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF;

j = A taxa de prenhez foi estimada de acordo com a fórmula: nº de novilhas prenhes 60 dias após a IATF / nº de novilhas submetidas ao protocolo de IATF que ovularam;

k = A taxa de perda gestacional foi calculada pela diferença da taxa de prenhez aos 60 dias e 30 dias;

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores focaram no entendimento do padrão de liberação das gonadotrofinas em resposta ao tratamento com Kisspeptina (Kiss) em bezerras e vacas (KADOKAWA et al., 2008; WHITLOCK et al., 2008; NANIWA et al., 2013; LEONARDI et al., 2018; MACEDO et al., 2019). A nosso conhecimento, este é o primeiro relato científico que avalia o efeito do tratamento com Kiss intramuscular no momento da IATF na resposta ovariana e na fertilidade de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) pré-púberes ao sobreano.

Embora no presente estudo não tenha sido avaliado o padrão de liberação de LH em resposta aos tratamentos realizados, Kadokawa et al. (2008) verificaram aumento na liberação de LH após 27 ± 3 minutos após o tratamento com 1 mg de Kiss i.v. em novilhas Holandesas pré-púberes. Outros autores compararam a via de administração da Kiss e também observaram que as concentrações plasmáticas de LH se mantiveram elevadas por 1h após o tratamento intravenoso com 1 mg de Kiss, com pico de LH aos 15 min após a administração (LEONARDI et al., 2018). Esses achados foram 2,2 vezes maior que o tratamento intramuscular com 1 mg de Kiss e 6,8 vezes maior que o grupo controle (solução salina; LEONARDI et al., 2018). Em novilhas da raça Nelore o aumento da secreção de LH em resposta ao tratamento intramuscular com Kiss pôde ser verificado a partir dos 11 meses de idade (PAIVA, 2018). Estudos relataram efeito dose-dependente ao comparar o perfil de liberação de LH em novilhas da raça Gir (6 a 10 meses de idade) e Holandesas (5 a 8 meses de idade) tratadas 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg e 10,0 mg/kg de Kiss. Verificou-se menor área sob a curva em novilhas tratadas com 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg quando comparadas às novilhas tratadas com 10,0 mg/kg (MACEDO et al., 2019). Além disso, os mesmos autores também observaram efeito de raça para o perfil de liberação de LH após o tratamento com Kiss. As novilhas Gir apresentaram menor área sob a curva que as novilhas Holandesas. Independente da raça, os tratamentos com Kiss promoveram um pico de LH que se iniciou 3 a 4 minutos e com máxima concentração aos 20 e 27 minutos após o tratamento (MACEDO et al., 2019). Entretanto, as novilhas que receberam o tratamento com 0,01mg de acetato de buserelina apresentaram atraso no pico de LH (132 minutos após o tratamento), quando comparadas as novilhas tratadas com Kiss (MACEDO et al., 2019). Não houve diferença entre os grupos genéticos para o pico de LH e para área sob a curva nas novilhas tratadas com GnRH

(MACEDO et al., 2019). Diferentemente, Batista et al. (2017) relataram menor resposta ao GnRH em novilhas Nelore quando comparadas com novilhas Holandesas. A amplitude do pico de LH e a área sob a curva foram maiores nas novilhas Holandesas que em novilhas Nelore (BATISTA et al., 2017). Outros estudos demonstraram que o pico de LH foi potencializado após o tratamento BE associado à Kiss quando comparado ao pico de LH de fêmeas Nelore ovariectomizadas tratadas somente com Kiss ou GnRH (MACEDO et al., 2013). De acordo com o relatado por Macedo et al. (2014) foi possível observar aumento dos níveis de LH em búfalas ovariectomizadas após o tratamento com 10µg/ Kg de Kiss e 0,01mg de acetato de buserelina (GnRH). Da mesma forma que nas espécies supra-citadas, o tratamento com Kiss por infusão lenta ou por bolus foi capaz de aumentar o nível de LH em éguas, apesar de não ser detectada ovulação (MAGEE et al., 2009; DECOURT et al., 2014).

Observou-se que em novilhas Nelore ovariectomizadas o pico de LH ocorreu $50,5 \pm 3,6$ horas após o tratamento com CE (SALES et al., 2012). Ainda, foi verificado por Gimenes et al. (2008) que a ovulação de folículos maiores que 8,5mm ocorre aproximadamente 30 horas após administração de LH. Ainda, verificou-se que a ovulação ocorre entre $68,6 \pm 1,9$ (SALES et al., 2012) e $71,1 \pm 3,6$ horas (TORRES-JÚNIOR et al., 2014) após o tratamento com 1mg de CE como indutor da ovulação no momento da retirada da fonte de P4 em vacas Nelore submetidas a um protocolo de sincronização à base de P4/E2. Semelhantemente, em vacas da raça Holandesa em lactação a ovulação ocorre entre $71,3 \pm 2,9$ (FERREIRA et al., 2015) e $75,1 \pm 2,7$ horas (SOUZA et al., 2009) após o tratamento com CE no momento da retirada da fonte de P4. Ainda, foi verificado que o tratamento com GnRH no momento da IATF não resultou em benefício para a sincronização da ovulação, tanto de forma isolada (CE vs. GnRH; SOUZA et al., 2009) ou associada (CE + GnRH; FERREIRA et al., 2015). Da mesma forma, a associação de CE com GnRH (48 ou 54 horas após o tratamento com CE) não resultou em melhor sincronia do momento da ovulação em vacas Nelore (TORRES-JÚNIOR et al., 2007). No presente estudo, em conformidade com os achados da literatura, não se verificou efeito do tratamento com Kiss ou GnRH 48 horas após o tratamento com CE no intervalo da retirada da fonte de P4 e a ovulação (média de $76,6 \pm 10,6$ horas).

Quando se comparou o tratamento com CE no momento da retirada do dispositivo de P4 com o tratamento com GnRH 48 horas após a remoção do dispositivo de P4, não foi verificado efeito do estímulo ovulatório na amplitude do pico

de LH, área sob a curva de LH e intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação em vacas Holandesas (SOUZA et al., 2009). Da mesma forma, outros estudos não encontraram diferenças na taxa de ovulação após o tratamento com GnRH ou CE em vacas Nelore (MENEGETTI et al., 2009) e Holandesa (SOUZA et al., 2009; FERREIRA et al., 2015).

Em estudo conduzido por Naniwa et al. (2013), os autores demonstraram que o tratamento com Kiss também pode ser utilizado como indutor de ovulação em bovinos. Estes pesquisadores verificaram que a ovulação ocorreu em 25% (1/4) dos animais 30 horas após o tratamento com 2,0 nmol/kg de Kiss (NANIWA et al., 2013). No Brasil, estudos foram realizados para verificar a taxa ovulação do folículo dominante após o tratamento com Kiss (Kiss-10) no diestro (dia 6 do ciclo estral) durante a primeira onda de crescimento folicular em vacas Holandesas. Verificou-se 42,1% (8/19) de ovulação após o tratamento com Kiss, semelhantemente ao observado após o tratamento com GnRH (31%; 5/16). Ambos os tratamentos apresentaram maior taxa de ovulação quando comparados ao grupo controle (0%; 0/12; MACEDO et al., 2013). Semelhantemente, ovelhas adultas que receberam tratamento intravenoso com Kiss apresentaram taxa de ovulação superior (80%; 4/5) quando comparadas às ovelhas controle (17%; 1/6; CARATY et al., 2007). No presente estudo, não se verificou efeito do tratamento com Kiss na sincronização e na taxa de ovulação. Também, essas variáveis não foram afetadas pelo tratamento com GnRH. Dessa forma, os resultados obtidos são indicativos de que o intervalo entre a retirada da fonte de progesterona e a ovulação e a taxa de ovulação são semelhantes nas novilhas do grupo controle (tratadas somente com CE na retirada da fonte de P4), do grupo GnRH e do grupo Kiss (tratadas com CE na retirada da fonte de P4 e com GnRH e Kiss na IATF, respectivamente). A ausência de efeito adicional aos tratamentos (Kiss ou GnRH) pode ser justificado pelo tratamento com CE como indutor de ovulação em todos os animais submetidos ao protocolo experimental, que proporcionou eficientes taxa de ovulação e ovulação sincronizada.

Vacas de corte taurinas tratadas com 15 mg i.v. de Kiss apresentaram maior diâmetro do folículo dominante quando comparadas às vacas do grupo controle (LEONARDI et al., 2018). Entretanto, os mesmos autores não encontraram diferenças no diâmetro do maior folículo quando compararam o tratamento com 15 mg i.v. de Kiss aos tratamentos com 100 µg i.m. de GnRH e 10mg i.v. de Kiss. Desta forma, o tratamento com 15 mg i.v. de Kiss resultou no aumento do diâmetro do folículo

dominante. Porém falhou na indução de ovulação quando administrado no diestro em comparação aos animais que receberam o tratamento com GnRH, que foi capaz em induzir a ovulação em 77,8% (14/18) dos animais (LEONARDI et al., 2018). O tratamento com GnRH concomitantemente à IATF não foi capaz de aumentar a taxa de ovulação após o protocolo de sincronização (CONSENTINI et al., 2017; MADUREIRA et al., 2018). Porém, esses autores não avaliaram o efeito da expressão de estro (entre a retirada da fonte de P4 e a IATF) sobre o tratamento na taxa de ovulação. No presente estudo foi verificado efeito da manifestação de estro e sua interação com o tratamento na taxa de ovulação. As novilhas que não apresentaram o comportamento de estro e receberam o tratamento com GnRH apresentaram aumento na taxa de ovulação. Porém, esse resultado não foi observado nas novilhas que não receberam tratamento (Controle) e nas novilhas tratadas com Kiss. Pôde-se observar que as novilhas que demonstraram o comportamento de estro entre o momento da retirada da fonte exógena de P4 e a IATF apresentam maior diâmetro do folículo no D8 e no D10, maior taxa de ovulação, maior diâmetro do CL sete dias após a IATF e maior P/IA aos 30 e 60 dias após a IATF. Semelhantemente, em vacas Nelore lactantes Sá Filho et al. (2011) observaram aumento do diâmetro do maior folículo na IATF, maior taxa de ovulação, maior diâmetro do CL e elevação das concentrações séricas de progesterona sete dias após a IATF em vacas que demonstraram estro em comparação às que não demonstraram. Corroborando com esses dados, diversos estudos (SÁ FILHO et al., 2010b, 2010c, 2011b; PITALUGA et al., 2013; RICH et al., 2018) demonstram que o comportamento do estro, entre a retirada da fonte exógena de P4 e a IATF, está associado com a melhoria da fertilidade em vacas submetidas à protocolos de sincronização para IATF.

Em estudos anteriores que avaliaram o efeito isolado dos diferentes estímulos ovulatórios, quando se comparou somente o tratamento com estradiol (CE) no momento da retirada do dispositivo com o tratamento com GnRH 48 horas após a remoção do dispositivo de P4 não houve efeito do estímulo ovulatório (CE ou GnRH) na taxa de prenhez à IATF (MENEGETTI et al., 2009). Como observado no presente estudo, houve efeito da ocorrência de estro na taxa de prenhez, porém não houve efeito dos tratamentos (Kiss e GnRH) na taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a IATF.

Uma das possibilidades estudadas para diminuir a diferença de fertilidade entre fêmeas bovinas que manifestaram ou não estro é o tratamento com GnRH no

momento da IATF. O tratamento com GnRH na IATF apresenta ainda resultados científicos conflitantes. Sá Filho et al. (2011) não verificaram aumento na taxa de prenhez em vacas tratadas somente com CE no momento da retirada da fonte de P4 quando comparadas às vacas tratadas com CE na retirada associado ao GnRH no momento da IATF. Entretanto, as vacas tratadas com CE na retirada apresentaram maior taxa de prenhez quando comparadas as vacas que receberam somente o GnRH na IATF. Nesse estudo também foi demonstrado que o tratamento com GnRH na IATF não aumentou a taxa de prenhez em animais que não demonstraram o comportamento de estro (SÁ FILHO et al., 2011). Da mesma forma que pesquisadores verificaram que seu efeito é nulo para o aumento da taxa de prenhez à IATF (SÁ FILHO et al., 2011b; MADUREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2018). Entretanto, outros pesquisadores encontraram efeito benéfico somente nas fêmeas que não manifestaram comportamento de estro (NOGUEIRA et al., 2016; CONSENTINI et al., 2017; PRATA et al., 2018). Contudo, foi relatado por outros autores o efeito benéfico do tratamento com GnRH na IATF em fêmeas que apresentaram ou não comportamento de estro (FERREIRA et al., 2017; GONÇALES-JUNIOR et al., 2017). A melhora na fertilidade de vacas tratadas com GnRH pode ser atribuída à melhora na sincronização do pico de LH e ao aumento da taxa de ovulação por expor o folículo pré-ovulatório à maiores concentrações de LH e por melhorar a função luteínica no diestro subsequente (KAIM et al., 2003). Entretanto, outros estudos demonstraram uma tendência de diminuição das concentrações de P4 no diestro subsequente em novilhas de corte tratadas com GnRH no momento da IA (PERRY; PERRY, 2009). Ainda, estudos foram indicativos de que, em vacas que já tinham apresentado pico endógeno de LH durante o estro, o tratamento com GnRH induziu um pico de LH de menor duração e magnitude (LUCY; STEVENSON, 1986). Adicionalmente, estudos são sugestivos de que os efeitos positivos do tratamento com GnRH durante o estro parecem ser mais benéficos em fêmeas com fertilidade reduzida, ou quando o tratamento é realizado próximo ao início do estro (ou seja, próximo ao pico espontâneo de LH; SÁ FILHO et al., 2010a).

No presente estudo foram utilizadas somente novilhas sem CL (pré-púberes), neste caso o desenvolvimento de um folículo na ausência de um CL funcional (baixa P4) pode resultar aumento do crescimento do folículo dominante e maiores concentrações de E2 durante o proestro (MESQUITA et al., 2014). Essas respostas podem melhorar a fertilidade (CARVALHO et al., 2008; PERES et al., 2009) pelo

aumento dos níveis de E2 circulante estar relacionado à vários processos fisiológicos que contribuem para melhorar o ambiente uterino que colabora para o estabelecimento e manutenção da gestação (SÁ FILHO et al., 2017). Estudos evidenciaram efeitos positivos do E2 na proliferação das células foliculares, no transporte dos espermatozoides e dos oócitos, bem como a preparação do ambiente uterino (POHLER et al., 2012; DAVOODI et al., 2016). Mudanças no ambiente uterino, incluindo mudanças no pH seguido da expressão de estro, afetam a longevidade e o transporte espermático, que podem aumentar a viabilidade espermática e o tempo para fertilização (PERRY; PERRY, 2008).

Houve efeito de touro na P/IA aos 30 e 60 dias, assim como no tamanho do embrião no momento do diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF. Foi relatado por Sá Filho et al. (2009) que a diferença na fertilidade de touros é um ponto crítico para o sucesso da técnica de IATF. A fertilidade entre touros, pode ser definida pela capacidade de fertilização e manutenção da gestação, porém os fatores que interferem na taxa de prenhez e perda gestacional ainda são poucos conhecidos (FRANCO et al., 2018). Haja vista que a taxa de fertilização em novilhas Holandesas é de 100% (SARTORI et al., 2002). A sobrevivência embrionária é influenciada por diversos fatores (revisado por LONERGAN; FAIR, 2014; FORDE; LONERGAN, 2017). Foi observado por Franco et al. (2018) tendência na redução da concentração de proteínas associadas à gestação (PAG's; 30 dias pós IATF) em touros com maior perda gestacional (FRANCO et al., 2018).

No presente estudo, contrariando a hipótese inicial, não se verificou efeito positivo do tratamento com Kiss ou GnRH no momento da IATF na taxa de prenhez. Ainda, existem estudos que evidenciaram reduzida sensibilidade hipotalâmica ao E2 em novilhas pré-púberes. As concentrações circulantes de E2 ao final do protocolo de IATF são elevadas devido à presença de um folículo dominante, além do tratamento com estradiol (SÁ FILHO et al., 2010c, 2011b; BARUSELLI et al., 2012a). Em novilhas pré-púberes o tratamento com E2 poderia causar comprometimento da liberação de LH e com consequente regressão do folículo dominante, bloqueio ou atraso da ovulação. De acordo com o relato de Freitas, (2015), novilhas Nelore de 14 meses ovularam em média 73,6 % e apresentaram taxa de prenhez à IATF de 35,7%. Entretanto, o autor verificou que lotes com elevada taxa de ovulação (78,4%) apresentaram 54,5% de taxa de prenhez à IATF. Esses dados são sugestivos de que tratamentos farmacológicos para indução de puberdade que aumentam a taxa de

ovulação ao final dos protocolos de IATF apresentam elevada probabilidade de aumentar a taxa de prenhez.

Day et al. (1984) discutem que o início da puberdade se dá pelo decréscimo da sensibilidade negativa ao E2. Em novilhas ovariectomizadas tratadas com implante de E2 foi possível verificar bloqueio da secreção de LH, diferentemente das novilhas ovariectomizadas do grupo controle (sem exposição ao E2). Entretanto, outros autores observaram que foi possível aumentar a pulsatilidade de LH em novilhas taurinas de corte tratadas com norgestomet (HALL et al., 1997). Ainda, existem relatos na literatura que após a primeira ovulação e formação do CL, pode ser observado ciclos curtos devido ao fato da ocorrência da liberação da PGF2 α antes do reconhecimento materno da gestação (revisado por PERRY, 2016). Desta forma, existem protocolos de sincronização para indução da puberdade em novilhas Nelore que proporcionam exposição exógena à P4 com o intuito de diminuir a sensibilidade hipotalâmica ao E2 e evitar a ocorrência de ciclos curtos após o protocolo de IATF (RODRIGUES et al., 2013, 2014; SÁ FILHO et al., 2015). Freitas (2015) observou que o protocolo de indução de puberdade aumentou a ciclicidade no início do protocolo de IATF, mas não aumentou a taxa de prenhez após a IATF de novilhas Nelore de 14 meses de idade (FREITAS, 2015). Day & Anderson, (1998) relataram que o número de neurônios contendo ER α na área pré-óptica diminuiu com o tratamento com progesterona. Os autores também verificaram correlação negativa da expressão de receptores de estrógeno no hipotálamo anterior e no núcleo ventromedial em novilhas pré-púberes tratadas com progestágeno (Norgestomet; DAY; ANDERSON, 1998). Desta forma, pode-se inferir que o tratamento prévio com o protocolo de sincronização à base de P4/E2 diminuiu a sensibilidade negativa ao estrógeno nas novilhas submetidas no presente experimento, reduzindo a resposta aos tratamentos utilizados no presente estudo. Dessa forma, a hipótese de que o tratamento com Kiss ou GnRH no momento da IATF aumentaria a taxa de ovulação, com melhora da sincronização da ovulação e aumento da taxa de prenhez em novilhas Nelore pré-púberes não foi confirmada.

6 CONCLUSÕES

6.1. *No Experimento 1 foi possível concluir que:*

O diâmetro do folículo ovulatório, a taxa de ovulação e a dispersão das ovulações não diferiram entre os tratamentos, rejeitando a hipótese inicial.

6.2. *No Experimento 2 foi possível concluir que:*

A taxa de ovulação, o diâmetro do CL no diestro subsequente, bem como a taxa de prenhez (30 e 60 dias após a IATF), o tamanho do embrião e a perda gestacional não diferiram entre os tratamentos, rejeitando a hipótese inicial;

6.3. *Conclusões gerais*

Diante das finalidades propostas, não foi confirmada a hipótese que o tratamento com Kiss ou GnRH no momento da IATF aumentaria a taxa de ovulação, com melhora na sincronização da ovulação, aumento da taxa de prenhez e redução da perda gestacional em novilhas Nelore pré-púberes.

REFERÊNCIAS

- ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C. M. B. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 373–387, 2004.
- ALVES, B. R. C.; CARDOSO, R. C.; PREZOTTO, L. D.; THORSON, J. F.; SHARPTON, S. M.; CARATY, A.; KEISLER, D. H.; TEDESCHI, L. O.; WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M. Elevated Body Weight Gain During the Juvenile Period Alters Neuropeptide Y-Gonadotropin-Releasing Hormone Circuitry in Prepubertal Heifers. v. 92, p. 1–10, 2015.
- AMSTALDEN, M.; CARDOSO, R. C.; ALVES, B. R. C.; WILLIAMS, G. L. Reproduction Symposium: Hypothalamic neuropeptides and the nutritional programming of puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 8, p. 3211–3222, 2014.
- AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R.; STANKO, R. L.; NIZIELSKI, S. E.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; WILLIAMS, G. L. Central Infusion of Recombinant Ovine Leptin Normalizes Plasma Insulin and Stimulates a Novel Hypersecretion of Luteinizing Hormone after Short-Term Fasting in Mature Beef Cows¹. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1555–1561, 2002.
- AMSTALDEN, M.; HARMS, P. G.; WELSH, T. H.; RANDEL, R. D.; WILLIAMS, G. L. Effects of leptin on gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from adenohypophyseal primary cell cultures: Further evidence that fully nourished cattle are resistant to leptin. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1–2, p. 41–52, 2005.
- ANUALPEC. **Rebanho Bovino Brasileiro - 2017**. Disponível em: <<http://www.agrianual.com.br/>>. Acesso em: 7 nov. 2018.
- ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and Endocrinology of Puberty in Heifers. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, p. 479–492, 2013.
- AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DE LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 175–179, ago. 2009.
- AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; PENTEADO, L.; D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S. Inferences of body energy reserves on conception rate of suckled Zebu beef cows

subjected to timed artificial insemination followed by natural mating. **Theriogenology**, v. 82, n. 4, p. 529–536, 2014.

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, 2017. p. 45–56.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, 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, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 134–141, 2012a.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; FILHO, M. F. S. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139–152, 2012b.

BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H. de; SÁ, M. F. de; MARQUES, M. O.; SALES, J. N. de S. Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 247–255, 2018.

BATISTA, E. O. S.; DEL VALLE, T. A.; ORTOLAN, M. D. D. V.; RENNÓ, F. P.; NOGUEIRA, G. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. The effect of circulating progesterone on magnitude of the GnRH-induced LH surge: Are there any differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers? **Theriogenology**, v. 104, p. 43–48, 2017.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193–204, 1995.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.

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. **Society of Reproduction and Fertility**

supplement, v. 64, p. 223–36, jan. 2007.

CARATY, A.; DECOURT, C.; BRIANT, C.; BELTRAMO, M. Kisspeptins and the reproductive axis: Potential applications to manage reproduction in farm animals.

Domestic Animal Endocrinology, v. 43, n. 2, p. 95–102, 2012.

CARATY, A.; SMITH, J. T.; LOMET, D.; BEN SAÏD, S.; MORRISSEY, A.; COGNIE, J.; DOUGHTON, B.; BARIL, G.; BRIANT, C.; CLARKE, I. J. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes.

Endocrinology, v. 148, n. 11, p. 5258–5267, 2007.

CARDOSO, R. C.; ALVES, B. R. C.; PREZOTTO, L. D.; THORSON, J. F.; TEDESCHI, L. O.; KEISLER, D. H.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Reciprocal changes in leptin and NPY during nutritional acceleration of puberty in heifers. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. 289–298, 2014a.

CARDOSO, R. C.; ALVES, B. R. C.; PREZOTTO, L. D.; THORSON, J. F.; TEDESCHI, L. O.; KEISLER, D. H.; PARK, C. S.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Use of a stair-step compensatory gain nutritional regimen to program the onset of puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 7, p. 2942–2949, 2014b.

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**, v. 69, p. 167–175, 2008.

CLARKSON, J.; HAN, S. K.; LIU, X.; LEE, K.; HERBISON, A. E. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 324, n. 1–2, p. 45–50, 2010.

CLARO JÚNIOR, 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, p. 903–911, 2010.

COLLI, M. H. A.; REZENDE, R. G.; ELLIFF, F. M.; ZANATTA, G. M.; MINGOTI, R. D.; GONÇALES-JUNIOR, W. A.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Productive and reproductive correlations that influence the pregnancy rate of 14 month old Nelore heifers submitted to 3 FTAI in 48 days using color Doppler ultrasonography. In: Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017. Abstracts.,

Cabo do Santo Agostinho - PE. **Anais...** Cabo do Santo Agostinho - PE: Animal Reproduction, 2017.

CONSENTINI, C. E. C.; MADUREIRA, G.; MOTTA, J. C. L.; MELO, L. F.; PRATA, A. B.; GONÇALVES, J. R. S.; MOTEIRO-JR, P. L. J.; ALVARENGA, A. B.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to 7-D FTAI protocols initiated with estradiol benzoate or GnRH and with or without GnRH at the time of AI. In: Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Animal Reproduction, 2017.

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**, v. 125, p. 277–284, 2019.

DAVOODI, S.; COOKE, R. F.; FERNANDES, A. C. C.; CAPPELLOZZA, B. I.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 645–655, 2016.

DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current Concepts on the Control of Puberty in Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, 1998.

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

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOCK, 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 hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1054–65, 1987.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.-C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J.-L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003.

DECOURT, C.; CARATY, A.; BRIANT, C.; GUILLAUME, D.; LOMET, D.; CHESNEAU, D.; LARDIC, L.; DUCHAMP, G.; REIGNER, F.; MONGET, P.; DUFOURNY, L.; BELTRAMO, M.; DARDENTE, H. Acute Injection and Chronic Perfusion of Kisspeptin Elicit Gonadotropins Release but Fail to Trigger Ovulation in the Mare¹. **Biology of**

Reproduction, v. 90, n. 2, p. 1–12, 2014.

ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; TEIXEIRA, L. A. Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de Corte**. I ed. Piracicaba: Fealq, 2010. p. 801–811.

ELER, J. P.; SILVA, J. A. I. I. V.; FERRAZ, J. B. S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H. N.; EVANS, J. L.; GOLDEN, B. L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 951–954, 2002.

ELER, J. P.; SILVA, J. A. I. I. V.; EVANS, J. L.; FERRAZ, J. B. S.; DIAS, F.; GOLDEN, B. L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nellore cattle The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Additive genetic relationships bet. **Journal of Animal Science**, n. October, p. 2519–2527, 2004.

EZZAT-AHMED, A.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; GOTO, Y.; NAKAJIMA, Y.; JIN, J.; YAMASHITA, T.; K.SAWAI; HASHIZUME, T. The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 3–4, p. 267–272, 2010.

FERRAZ-JÚNIOR, M. V. C.; BIEHL, M. V.; GOUVÊA, V. N.; POLIZEL, D. M.; RIBEIRO, A. D. B.; SANTOS, M. H.; SILVA, R. G.; MOREIRA, E. M.; FALEIRO-NETO, J. A.; PIRES, A. V. PUBERDADE EM NOVILHAS ZEBUÍNAS: MANEJO E MECANISMOS PARA A ANTECIPAÇÃO. In: **NOVOS DESAFIOS DA PESQUISA EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL**. Pirassununga-SP: 5DEditora, 2014.

FERREIRA, E. M.; FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; NEPOMUCENO, D. D.; BIEHL, M. V.; MENDES, C. Q.; PIRES, A. V. Efeito da produção de novilhas à pasto sobre a puberdade. In: RODRIGUES, R. C.; PARANTE, M. O. (ORG. . (Ed.). **SIMPRUPASTO: o uso da ciência e de tecnologias para a mudança de paradigmas**. I ed. Chapadinha: Edufma, 2012. p. 128–158.

FERREIRA, R. M. A.; AYRES, H. C.; GIMENES, L. U.; TORRES, F. P. E.; LIMA, F. A. E.; VERAS, M. B.; GUIDA, T. G.; SALA, R. V.; BARUSELLI, P. S. Inducing ovulation with oestradiol cypionate allows flexibility in the timing of insemination and removes the need for gonadotrophin-releasing hormone in timed AI protocols for dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. RD15270, 2015.

FERREIRA, R. M.; GONÇALES-JUNIOR, W. A.; SARAN-JUNIOR, A. J.; GONÇALVES, R. L.; LOLLATO, J. P. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S.

Treatment with GnRH (Gonaxal®) at AI increases pregnancy rate of nelore cyclic heifers that showed or not estrus during the TAI protocol, with greater impact in those without estrus demonstration. In: Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Cabo do Santo Agostinho. **Anais...** Cabo do Santo Agostinho: 2017.

FINN, P. D.; CUNNINGHAM, M. J.; PAU, K. Y. F.; SPIES, H. G.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4652–4662, 1998.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Interferon-tau and fertility in ruminants. **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F33–F43, 2017.

FOSTER, D.L., JACKSON, L. M. Puberty in the Sheep. In: PLANT, T.M., PFAFF, D.W., CHALLIS, J.R.G., KRETZER, D.M.D., RICHARDS, J.S., WASSARMAN, P. M. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3rd. ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 2127–2176.

FOSTER, D. L.; KARSCH, F. J. Development of the Mechanism Regulating the Preovulatory Surge of Luteinizing Hormone in Sheep¹. **Endocrinology**, v. 97, n. 5, p. 1205–1209, 1975.

FRANCO, G. A.; PERES, R. F. G.; MARTINS, C. F. G.; REESE, S. T.; VASCONCELOS, J. L. M.; POHLER, K. G. Sire contribution to pregnancy loss and pregnancy-associated glycoprotein production in nelore cows. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 2, p. 632–640, 2018.

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**. 2015. São Paulo. 85p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2015.

GAHETE, M. D.; VÁZQUEZ-BORREGO, M. C.; MARTÍNEZ-FUENTES, A. J.; TENA-SEMPERE, M.; CASTAÑO, J. P.; LUQUE, R. M. Role of the Kiss1/Kiss1R system in the regulation of pituitary cell function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 438, p. 100–106, 2016.

GAMBA, M.; PRALONG, F. P. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: The role of leptin and insulin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 254–255, p. 133–139, 2006.

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. 852–858, 2008.
- GONÇALES-JUNIOR, W. A.; SARAN-JUNIOR, A. J.; GONÇALVES, R. L.; LOLLATO, J. P. M.; SALES, J. N. S.; MINGOTI, R. D.; BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M. Treatment with GnRH (Gonaxal®) at AI increases pregnancy rate of Nelore primiparous cows that showed or not estrus during the TAI protocol. In: Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Cabo do Santo Agostinho. **Anais...** Cabo do Santo Agostinho: Animal Reproduction, 2017.
- 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, n. 6, p. 1606–11, jun. 1997.
- HAUSMAN, G. J.; BARB, C. R.; LENTS, C. A. Leptin and reproductive function. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2075–2081, 2012.
- HOLM, D. E.; THOMPSON, P. N.; IRONS, P. C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 87, n. 6, p. 1934–40, jun. 2009.
- HUFFMAN, L. J.; INSKEEP, E. K.; GOODMAN, R. L. Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. April 2014, p. 755–761, 1987.
- IBGE. **Sistema de Recuperação Automática (SIDRA)**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2017>>. Acesso em: 5 nov. 2018.
- IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 4, p. 264–272, 2004.
- JOHNSON, S. K.; FUNSTON, R. N. Postbreeding heifer management. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 627–641, 2013.
- KADOKAWA, H.; MATSUI, M.; HAYASHI, K.; MATSUNAGA, N.; KAWASHIMA, C.; SHIMIZU, T.; KIDA, K. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. **Journal of Endocrinology**, v. 196, p. 331–334, 2008.

- KAIM, M.; BLOCH, A.; WOLFENSON, D.; BRAW-TAL, R.; ROSENBERG, M.; VOET, H.; FOLMAN, Y. Effects of GnRH Administered to Cows at the Onset of Estrus on Timing of Ovulation, Endocrine Responses, and Conception. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2012–2021, 2003.
- KAWWASS, J. F.; SUMMER, R.; KALLEN, C. B. Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: A critical review. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 617–632, 2015.
- KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34631–34636, 2001.
- LEHMANN, M. N.; KARSCH, F. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 887–895, 1993.
- LEONARDI, C. E. P.; DIAS, F. C. F.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Effect of Kisspeptin-10 on plasma luteinizing hormone concentrations and follicular dynamics during the luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 119, p. 268–274, 2018.
- 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, 1973.
- LOBATO, J. F. P.; FREITAS, A. K.; DEVINCENZI, T.; CARDOSO, L. L.; TAROUÇO, J. U.; VIEIRA, R. M.; DILLENBURG, D. R.; CASTRO, I. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 336–345, 2014.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 49–55, 2014.
- LUCY, M. C.; STEVENSON, J. S. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrus and postinsemination periods in dairy cattle. **Biology of reproduction**, v. 35, n. 2, p. 300–311, 1986.
- MACEDO, G. G.; CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; SANTOS, R. M.; JACOMINI,

- J. O.; BARUSELLI, P. S. Kisspeptin stimulates LH release in buffalo cows in the breeding and nonbreeding season. In: Proceedings of the 28th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 14 to 17th, 2014, Natal, RN, Brazil. Abstracts, Natal - RN. **Anais...** Natal - RN: Animal Reproduction, 2014.
- MACEDO, G. G.; MAIO, J. R. G.; MONTEIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SOARES, J. G.; SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, G. M. G.; MENDANHA, M. F.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Kisspeptin stimulates LH release , is enhanced by estradiol and induces ovulation in bovine females. In: Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 29th to September 1st, 2013, Praia do Forte, BA, Brazil., **Anais...**Animal Reproduction, 2013.
- MACEDO, G. G.; MINGOTI, R. D.; BATISTA, E. O. S.; MONTEIRO, B. M.; VIEIRA, L. M.; BARLETTA, R. V.; WILTBANK, M. C.; NOGUEIRA, G. P.; RENNÓ, F. P.; MAIO, J. R.; BARUSELLI, P. S. Profile of LH release in response to intramuscular treatment with kisspeptin in *Bos indicus* and *Bos taurus* prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 125, p. 64–70, 2019.
- MADUREIRA, G.; DRUM, J. N.; CONSENTINI, C. E. C.; MOTTA, C. L.; SILVA, L. O.; PRATA, A. B.; CURY, M.; ELIAS, V.; LEMOS, R.; RODRIGUES, O.; GONÇALVES, J. R. S.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Effects of using either estradiol benzoate or GnRH at the beginning of a 7-d P4-based FTAI protocol with or without GnRH at the time of AI in Nelore heifers. In: Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018), Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Animal Reproduction, 2018.
- MAGEE, C.; FORADORI, C. D.; BRUEMMER, J. E.; ARREGUIN-AREVALO, J. A.; MCCUE, P. M.; HANDA, R. J.; SQUIRES, E. L.; CLAY, C. M. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2813–2821, 2009.
- MALHADO, C. H. M.; MALHADO, A. C. M.; MARTINS FILHO, R.; CARNEIRO, P. L. S.; PALA, A.; ADRIÁN CARRILLO, J. Age at first calving of Nelore cattle in the semi-arid region of northeastern Brazil using linear, threshold, censored and penalty models. **Livestock Science**, v. 154, n. 1–3, p. 28–33, 2013.
- MENEGHETTI, M.; SA 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. 179–189, 2009.

MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M. B.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861–869, 2014.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. J. R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1761–1766, 2005.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de lh, fsh, progesterona e estradiol em fêmeas bovinas nelore (bos taurus indicus), angus (bos taurus taurus), e nelore x angus (bos taurus indicus x bos taurus taurus)**. 2003. 2003.

NANIWA, Y.; NAKATSUKASA, K.; SETSUDA, S.; OISHI, S.; FUJII, N.; MATSUDA, F.; UENOYAMA, Y.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.; OHKURA, S. Effects of full-length kisspeptin administration on follicular development in Japanese Black beef cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 6, p. 588–594, 2013.

NAVARRO, V. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; CASTELLANO, J. M.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; GAYTAN, F.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; DIEGUEZ, C.; TENA-SEMPERE, M. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. **Journal of Physiology**, v. 561, n. 2, p. 379–386, 2004.

NETO, D. C.; MACEDO, G. G.; BARUSELLI, P. S. **PHARMACEUTICAL COMPOSTIONS COMPRISING KISSPEPTIN OR DERIVATIVES THEREOF** Estados Unidos da America Patent Application Publication, , 2016. .

NOGUEIRA, E.; RODRIGUES, W. B.; SILVA, A. S.; BORGES, J. C.; SILVA, K. C.; ANACHE, N. A.; BEZERRA, A. O.; LEÃO, B. C. S.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; MINGOTI, G. Z. GnRH application in cows with low or no estrus expression evaluated with tail-chalk increases the pregnancy rate in beef cows submitted to TAI. In: Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Animal Reproduction, 2016.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American Bos indicus (Zebu) cattle. **Animal**

Reproduction Science, v. 82–83, p. 361–372, 2004.

NRC. **Nutrient requirements of beef cattle: eighth revised edition**. Washington, DC: The National Academies Press, 2016.

OAKLEY, A.; OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin Signaling in the Brain. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. (6), p. 713–743, 2009.

OECD-FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - Agricultural Outlook 2015-2024**FAO, , 2015. .

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAOKA, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, 2001.

PAIVA, A. F. T. **VARIAÇÃO na resposta à kisspeptina para avaliação de precocidade sexual em novilhas nelore**. 2018. Universidade Estadual Paulista, 2018.

PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; FILHO, O. G. S.; 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**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 2009.

PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 373–378, 2016.

PERRY, G. A.; CUSHMAN, R. Effect of age at puberty/conception date on cow longevity. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 579–590, 2013.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 333–338, 2008.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 775–779, 2009.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; DO VALLE, E. R.; ENCARNÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (Bos indicus) with natural estrus or estrus induced with

prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 014, p. 667–681, 1998.

PINILLA, L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MILLAR, R. P.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. **Physiol Rev**, v. 92, p. 1235–1316, 2012.

PITALUGA, P. C. S. F.; SÁ FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S.; VINCENTI, L. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. v. 154, p. 229–234, 2013.

PLANT, T. M.; RAMASWAMY, S.; DIPIETRO, M. J. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 1007–1013, 2006.

POHLER, K. G.; GEARY, T. W.; ATKINS, J. A.; PERRY, G. A.; JINKS, E. M.; SMITH, M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 649–664, 2012.

PRATA, A. B.; 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. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to FTAI protocols with different duration of the intravaginal P4 device and with or without GnRH at the time of AI. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Animal Reproduction, 2018.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

REDMOND, J. S.; MACEDO, G. G.; VELEZ, I. C.; CARATY, A.; WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M. Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. **Reproduction**, v. 141, p. 541–548, 2011.

RICH, J. J. J.; NORTHROP, E. J.; LARIMORE, E. L.; PERRY, G. A. Influence of GnRH supplementation at CIDR removal on estrus expression and interval to estrus in beef cattle. **Theriogenology**, v. 119, p. 76–79, 2018.

RICHARD, N.; CORVAISIER, S.; CAMACHO, E.; KOTTLER, M. L. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 123–129, 2009.

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New frontiers

in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function.

Frontiers in Neuroendocrinology, v. 29, n. 1, p. 48–69, 2008.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Energy balance and puberty onset: Emerging role of central mTOR signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 9, p. 519–528, 2010.

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 Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 760–766, 2014.

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 Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 135–141, 2013.

ROELOFS, J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 327–344, 2010.

ROSEWEIR, A. K.; MILLAR, R. P. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 203–212, 2009.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; 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**, v. 73, n. 5, p. 651–658, 2010a.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1636–1642, 2010b.

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. 132–139, 2011a.

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. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010c.

SÁ FILHO, M. F.; GONELLA-DIAZA, A. M.; SPONCHIADO, M.; MENDANHA, M. F.; PUGLIESI, G.; RAMOS, R. dos S.; ANDRADE, S. C. da S.; GASPARIN, G.; COUTINHO, L. L.; GOISSIS, M. D.; MESQUITA, F. S.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrus beef cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.

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**, 2015.

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L.; REIS, T. A. N. P. S.; GALVÃO, K. N.; BARUSELLI, P. S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 625–632, 2013.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455–463, 2011b.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, 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, p. 182–187, 2010d.

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, n. 2, p. 210–218, 2009.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination

protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; GIROTTI, 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. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1–2, p. 12–8, 2011.

SAMADI, F.; BLACHE, D.; MARTIN, G. B.; D'OCCHIO, M. J. Nutrition, metabolic profiles and puberty in Brahman (*Bos indicus*) beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 134–142, 2014.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2803–2812, 2002.

SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 5, p. 1614–1627, 2003.

SILVA, J. A. I. I. D. V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. De. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um Rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1568–1572, 2005.

SILVA, J. A. V. I.; MELIS, M. H. Van; ELER, J. P.; BENTO, J.; FERRAZ, S. Estimação de Parâmetros Genéticos para Probabilidade de Prenhez aos 14 Meses e Altura na Garupa em Bovinos da Raça Nelore 1 Estimation of Genetic Parameters for Probability of Pregnancy at 14 Months and Hip Height in Nelore Beef Cattle. **Dados**, p. 1141–1146, 2003.

SILVA, L. O.; MADUREIRA, G.; CONSENTINI, C. E. C.; MOTTA, J. C. L.; ALVES, R. L. O. R.; PRATA, A. B.; MANICARDI, F. R.; LANNA, D. P. D.; WILTBANK, M. C.; SART. Effect of PGF2 α treatment at the start of an E2/P4-based FTAI protocol (7 days of P4 implant) on expression of estrus and fertility of Nelore females. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Animal Reproduction, 2018.

SKINNER, D. C.; CARATY, a; ALLINGHAM, R. Unmasking the Progesterone Receptor in the Preoptic Area and Hypothalamus of the Ewe: No Colocalization with

- Gonadotropin-Releasing Neurons. **Endocrinology**, v. 142, n. 2, p. 573–579, 2001.
- SMITH, J. T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 75–84, 2012.
- SMITH, J. T.; COOLEN, L. M.; KRIEGSFELD, L. J.; SARI, I. P.; JAAFARZADEHSHIRAZI, M. R.; MALTBY, M.; BATEMAN, K.; GOODMAN, R. L.; TILBROOK, A. J.; UBUKA, T.; BENTLEY, G. E.; CLARKE, I. J.; LEHMAN, M. N. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5770–5782, 2008a.
- SMITH, J. T.; LI, Q.; YAP, K. S.; SHAHAB, M.; ROSEWEIR, A. K.; MILLAR, R. P.; CLARKE, I. J. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. **Endocrinology**, v. 152, n. 3, p. 1001–1012, 2011.
- SMITH, J. T.; RAO, A.; PEREIRA, A.; CARATY, A.; MILLAR, R. P.; CLARKE, I. J. Kisspeptin Is Present in Ovine Hypophysial Portal Blood But Does Not Increase during the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge: Evidence that Gonadotropes Are Not Direct Targets of Kisspeptin in Vivo. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1951–1959, 2008b.
- SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; WILTBANK, M. C.; BO, G. A.; 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.
- SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; ALMEIRA E SILVA, M.; REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. C. G. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir-Leiteiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 6, p. 926–935, 1995.
- STORMSHAK, F.; BISHOP, C. V. Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: Genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 299–315, 2008.
- TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 and reproduction: Focus on its role in the metabolic regulation of fertility. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 5–6, p. 275–281, 2006a.
- TENA-SEMPERE, M. GPR54 and kisspeptin in reproduction. **Human Reproduction**

Update, v. 12, n. 5, p. 631–639, 2006b.

TOMIKAWA, J.; HOMMA, T.; TAJIMA, S.; SHIBATA, T.; INAMOTO, Y.; TAKASE, K.; INOUE, N.; OHKURA, S.; UENOYAMA, Y.; MAEDA, K.; TSUKAMURA, H. Molecular Characterization and Estrogen Regulation of Hypothalamic KISS1 Gene in the Pig1.

Biology of Reproduction, v. 82, n. 2, p. 313–319, 2010.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; MAGALHÃES, D.; ARAÚJO, R. L.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics in nelore cows (*Bos indicus*) treated with norgestomet ear implant associated with estradiol cypionate receiving GnRH at 48 or 54 hours after implant removal. In: Anais da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Costa do Sauípe. **Anais...** Costa do Sauípe: Acta Scientiae Veterinariae, 2007.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 1–2, p. 9–14, 2014.

UENOYAMA, Y.; PHENG, V.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 6, p. 537–545, 2016.

WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; PSZCZOLA, M.; CIESLAK, A.; LECHNIAK, D. Prepubertal heifers versus cows???The differences in the follicular environment. **Theriogenology**, v. 87, p. 36–47, 2017.

WATANABE, G.; TERASAWA, E. In vivo release of luteinizing hormone releasing hormone increases with puberty in the female rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 125, n. 1, p. 92–99, 1989.

WHITLOCK, B. K.; DANIEL, J. A.; WILBORN, R. R.; RODNING, S. P.; MAXWELL, H. S.; STEELE, B. P.; SARTIN, J. L. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. **Neuroendocrinology**, v. 88, n. 3, p. 212–215, 2008.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21–52, 2002.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 170–185, 2014.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.;

NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows.

Theriogenology, v. 76, n. 9, p. 1568–1582, 2011.

YOUNGQUIST, R. Pregnancy Diagnosis. In: YOUNGQUIST, R.; THRELFALL, W. (Ed.). **Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)**. Second

ed. Philadelphia: W.B.: Saunders Company, 2007. p. 294–303.