



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

**LOUISE CARNEIRO DE CARVALHO**

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE NOVILHAS BÚFALAS SUBMETIDAS À PROTOCOLOS  
DE INDUÇÃO DE CICLICIDADE**

**BELÉM - PA**

**2021**

LOUISE CARNEIRO DE CARVALHO

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE NOVILHAS BÚFALAS SUBMETIDAS À  
PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DE CICLICIDADE

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia - ReproAmazon da Universidade Federal Rural da Amazônia/Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro

BELÉM – PA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C331 Carvalho, Louise Carneiro de  
Eficiência reprodutiva de novilhas búfalas submetidas à protocolos de indução de ciclicidade /  
Louise Carneiro de Carvalho. - Belém, 2021.  
68 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia,  
Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2021.  
Orientador: Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro.

1. Búfalo. 2. Reprodução. I. Monteiro, Bruno Moura, orient. II. Título.

**CDD - 636.293**

---

**LOUISE CARNEIRO DE CARVALHO**

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE NOVILHAS BÚFALAS SUBMETIDAS À  
PROTÓCOLOS DE INDUÇÃO DE CICLICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação – ReproAmazon da Universidade Federal Rural da Amazônia para a obtenção do título de Mestre em reprodução animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

---

**Data da Aprovação**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro (Orientador)**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**

---

**Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda**  
**Universidade Federal do Pará**

---

**Dr. Domenico Vecchio**  
**Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Itália**

---

**Dr. Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho**  
**Instituto de Zootecnia - Registro/SP**



Comissão de Ética no  
Uso de Animais CEUA/UFRA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MANEJO REPRODUTIVO DE NOVILHAS BÚFALAS PRÉ-PÚBERES PARA PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)", protocolada sob o CEUA nº 5909300620 (ID 000152), sob a responsabilidade de **Bruno Moura Monteiro** e equipe; *Rinaldo Batista Viana; Johnny Luiz Silva de Oliveira; Manoel Domicio Gonçalves de Souza Júnior; Arthur Freitas Sepeda; Emanuelle Beatriz Ferreira Vasconcelos; Renata Gonzaga Costa ; Emanuelle Ferreira Pinto; João Lucas da Graça Andrade Costa; Janylle Adriane Gemaque Fonseca* - 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 Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 15/07/2020.

We certify that the proposal "Reproductive management of prepubertal buffalo heifers in timed artificial insemination programs (TAI)", utilizing 280 Buffalos (280 females), protocol number CEUA 5909300620 (ID 000152), under the responsibility of **Bruno Moura Monteiro** and team; *Rinaldo Batista Viana; Johnny Luiz Silva de Oliveira; Manoel Domicio Gonçalves de Souza Júnior; Arthur Freitas Sepeda; Emanuelle Beatriz Ferreira Vasconcelos; Renata Gonzaga Costa ; Emanuelle Ferreira Pinto; João Lucas da Graça Andrade Costa; Janylle Adriane Gemaque Fonseca* - 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 Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 07/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **07/2021** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bubalinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **12 a 24 meses**

N: **280**

Linhagem: **Mestiços de Murrah e Mediterrâneo**

Peso: **250 a 400 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado em uma fazenda que fica localizada no município de Tailândia (02°47'02,2" S 48°57'34,8" O), no Estado do Pará.

Belém, 01 de agosto de 2020

Prof. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural da Amazônia

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me permitir tantas vitórias, sendo esta mais uma delas, sei que nenhuma folha cai do chão sem a permissão de Deus, houve muitas mudanças no caminho, mas Deus esteve comigo em todos os momentos.

Ao meu marido e grande incentivador **Vinicius Nascimento**, por ter sido meu apoio, por sonhar junto comigo e ajudar a realizar cada sonho, obrigada por estar comigo nessa jornada!

Ao meu filho **Miguel de Carvalho Nascimento**, que mesmo ainda tão pequeno já me ensinou tantas coisas, e é minha maior fonte de inspiração diária!

**Aos meus pais**, por serem sempre tão solícitos e carinhosos, por terem sido minha base e me permitido conquistar tantas coisas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro**, por ter me orientado em mais este trabalho, e por ter sido sempre tão generoso em me passar um pouco do seu conhecimento e contribuir grandemente pro meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi**, que fez parte do meu comitê de orientação e fez grandes contribuições pra este trabalho, assim como contribuiu fortemente com o desenvolvimento da Reprodução Animal no nosso país, e que hoje, infelizmente não está mais conosco neste plano, obrigada professor!

Aos **funcionários da fazenda Alta floresta** por toda ajuda neste experimento.

À todos os **professores do PPG ReproAmazon** por serem incansáveis em fazer um programa de pós graduação de altíssima qualidade e por terem contribuído pra minha formação.

Aos **amigos de PPG** pela parceria nestes dois anos de mestrado!

E à todos os **amigos e professores** que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui!

## RESUMO

Este trabalho buscou avaliar a eficiência reprodutiva de novilhas búfalas pré-púberes ao final da estação de monta, após receberem um protocolo de indução de puberdade, seguido de um protocolo de IATF, ambos à base de P4 e E2. No início do protocolo de indução de puberdade, as novilhas receberam um implante intravaginal liberador de progesterona (P4) de 4º uso. Este implante permaneceu nos animais por 10 dias. Após 10 dias do início do protocolo de indução, o implante foi retirado e nos animais que estavam acíclicos foi administrado 0,5 mg de cipionato de estradiol. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais quanto ao momento de receber o protocolo de indução da puberdade: grupo Indução45 – recebeu o protocolo de indução de puberdade no Dia -55, com fim do protocolo de indução no Dia -45 e o início do protocolo de IATF no Dia 0; o grupo Indução12 - recebeu o protocolo de indução de puberdade no Dia -22, com o fim do protocolo de indução no Dia -12 e o início do protocolo de IATF no Dia 0; grupo Controle - não recebeu protocolo de indução de puberdade, somente o protocolo de IATF com início do Dia 0. Os animais de todos os grupos foram mantidos no mesmo lote de manejo e começaram o protocolo de IATF no mesmo momento (Dia 0). Após 15 dias da inseminação artificial em tempo fixo, os animais foram mantidos com touro na proporção de 1/25. Trinta dias após a IATF foi realizado o diagnóstico de gestação através de ultrassonografia, a taxa de prenhez do grupo Indução45 foi de 42,2%, grupo Indução12 foi de 44,2% e o grupo Controle obteve uma taxa de prenhez de 21,8%. Os animais que não haviam alcançado a puberdade ainda, após o protocolo de IATF conseguiram emprenhar no repasse com touro da estação de monta, e também as novilhas induzidas apresentaram uma tendência à emprenhar mais cedo que o grupo controle. Concluiu-se que os protocolos de indução de puberdade em novilhas búfalas pré-púberes aumenta a prenhez após a IATF, e que o intervalo de 12 dias entre o fim da indução e o início do protocolo de IATF pode ser preconizado, por apresentar semelhante P/IA que o intervalo de 45 dias, além de ser mais curto. O protocolo de IATF à base de P4/E2 é capaz de igualar as taxas de prenhez do repasse com o touro ao final da estação de monta e antecipa o momento da concepção, além disso o protocolo de IATF aumentou a eficiência do grupo controle.

**Palavras-chave:** Novilhas, indução de puberdade, IATF, estação de monta.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the reproductive efficiency of prepubertal buffalo heifers at the end of the breeding season, after receiving a puberty induction protocol, followed by an FTAI protocol, both based on P4 and E2. At the beginning of the puberty induction protocol, the heifers received a fourth-use progesterone-releasing intravaginal implant (P4). This implant remained in the animals for 10 days. After 10 days from the beginning of the induction protocol, the implant was removed and in animals that were acyclic, 0.5 mg of estradiol cypionate was administered. The animals were divided into 3 experimental groups regarding the time to receive the puberty induction protocol: Induction45 – received the puberty induction protocol on Day -55, with the end of the induction protocol on Day -45 and the beginning of the protocol of FTAI on Day 0; the Induction12 group - received the puberty induction protocol on Day -22, with the end of the induction protocol on Day -12 and the beginning of the FTAI protocol on Day 0; Control group - did not receive a puberty induction protocol, only the FTAI protocol starting on Day 0. The animals in all groups were kept in the same management batch and started the FTAI protocol at the same time (Day 0). After 15 days of fixed-time artificial insemination, the animals were kept with a bull in the proportion of 1/25. Thirty days after FTAI, the pregnancy diagnosis was performed by ultrasound, the pregnancy rate of the Induction45 group was 42.2%, Induction12 group was 44.2% and the Control group had a pregnancy rate of 21.8 %. The animals that had not yet reached puberty, after the FTAI protocol, managed to become pregnant in the transfer with a bull in the breeding season, and also the induced heifers showed a tendency to become pregnant earlier than the control group. It was concluded that puberty induction protocols in prepubertal buffalo heifers increase pregnancy after FTAI, and that the 12-day interval between the end of induction and the beginning of the FTAI protocol can be recommended, as it presents similar P /IA than the 45-day interval, in addition to being shorter. The FTAI protocol based on P4/E2 is able to equalize the pregnancy rates of the transfer with the bull at the end of the breeding season and anticipate the moment of conception, in addition, the FTAI protocol increased the efficiency of the control group.

**Keywords:** Heifers, puberty induction, IATF, breeding season.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Protocolo para indução de puberdade em novilhas búfalas com 45 e 12 dias de intervalo até o início do protocolo de IATF, grupo controle, avaliações ultrassonográficas e seus respectivos dias e período de entrada e saída do touro e duração da estação de monta.....42
- Figura 2** – Protocolo de sincronização da ovulação para a IATF.....43
- Figura 3** - Progressão da taxa de prenhez durante a estação de monta.....48

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Resultados da P/IA, prenhez por touro, prenhez total de IATF + touro, prenhez aos 45 dias da estação de monta, momento médio da concepção e perda gestacional.....45

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>P4</b>	progesterona
<b>E2</b>	estradiol
<b>IATF</b>	inseminação artificial em tempo fixo
<b>P/IA</b>	preñez por inseminação
<b>EM</b>	estação de monta
<b>LH</b>	hormônio luteinizante
<b>FSH</b>	hormônio folículo estimulante
<b>GnRH</b>	hormônio liberador de gonadotropinas
<b>IGF-1</b>	fator de crescimento semelhante à insulina
<b>IPP</b>	idade ao primeiro parto
<b>GH</b>	hormônio do crescimento
<b>rbST</b>	somatotropina bovina recombinante
<b>GRF</b>	fator liberador do hormônio de crescimento
<b>ER</b>	estação reprodutiva
<b>PGF</b>	prostaglandina
<b>BE</b>	benzoato de estradiol
<b>IM</b>	intramuscular
<b>eCG</b>	gonadotropina coriônica equina
<b>TP</b>	taxa de preñez

**ECC**    escore de condição corporal

**IA**     inseminação artificial

**FL**     folículo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Objetivos Específicos .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Início da vida reprodutiva de novilhas</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Fatores que influenciam no surgimento da puberdade .....	19
3.1.1.1 Nutrição e Genética .....	19
3.1.1.2 Efeito touro .....	23
3.1.2 Antecipação da puberdade .....	24
3.1.2.1 Indução hormonal .....	24
3.1.2.1.1 Indução com progesterona (P4) .....	25
3.1.2.1.2 Indução com melatonina .....	27
3.1.2.1.3 Indução com hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina recombinante bovina (rbST) .....	28
3.1.2.1.4 Intervalo entre a indução e o primeiro serviço .....	30
<b>3.2 IATF e eficiência reprodutiva</b> .....	<b>31</b>
3.2.1 Uso da IATF .....	31
3.2.2 IATF e eficiência reprodutiva de novilhas .....	33
3.2.3 IATF e eficiência reprodutiva de novilhas pré-púberes .....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Local de realização de experimento</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Características avaliadas e seleção dos animais</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3 Animais utilizados</b> .....	<b>40</b>

<b>4.4 Protocolo de indução de puberdade .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Protocolo de sincronização da ovulação para IATF .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Repasse com touro.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 Diagnóstico de gestação.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A idade ao primeiro parto é determinante na produtividade de um rebanho, sendo a idade à puberdade fundamental para o sucesso reprodutivo da fêmea em sua primeira estação reprodutiva (DAY; ANDERSON, 1998). Além disso, estudos sugerem que, além da puberdade, também é necessário um tempo de aproximadamente 3 ciclos estrais para que estas novilhas atinjam a máxima fertilidade (BYERLEY *et al.*, 1987; ROMANO, 1997). Portanto, procedimentos que antecipem o estro ovulatório em novilhas pré-púberes antes do início da estação de monta podem melhorar as taxas reprodutivas e acelerar o progresso genético do rebanho (BORGHESE; TERZANO; MAZZI, 2011).

Alguns dos principais fatores que influenciam a idade à puberdade em búfalos são nutrição, genética e exposição ao touro (BORGHESE *et al.*, 1993, 1994, 1996; TERZANO *et al.*, 1996). No entanto, assim como em bovinos (ANDERSON *et al.*, 1996; RASBY *et al.*, 1998; VOGG *et al.*, 2004; SÁ FILHO *et al.*, 2015), a indução hormonal exógena, que é capaz de simular as alterações fisiológicas que ocorrem em torno da puberdade, também pode ser utilizada para induzir a maturidade sexual das fêmeas bubalinas.

A antecipação da primeira ovulação em novilhas búfalas pré-púberes é descrita por meio de protocolos à base de progesterona ou melatonina (BARILE *et al.*, 2001; GHUMAN *et al.*, 2010; PERERA, 2011; GUIMARÃES, 2020). Além da estimulação hormonal para antecipação da puberdade, foi recentemente comprovado que os protocolos à base de progesterona e estradiol (P4/E2) indicados para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) também podem ser utilizados para induzir e sincronizar a primeira ovulação das novilhas búfalas pré-púberes (GUIMARÃES, 2020).

Em bovinos, diferentes intervalos entre os protocolos de indução da puberdade e de IATF, ambos à base de P4+E2, já foram descritos como bem-sucedidos. Foi observado aumento na prenhez por inseminação (P/IA) tanto quando o intervalo entre a indução e a IATF foi de 45 dias (REIS *et al.*, 2012) ou de 12 dias (RODRIGUES *et al.*, 2014). No entanto, essa associação nunca foi testada em novilhas búfalas pré-púberes. Desse modo, admitimos como hipótese que a indução de puberdade à base de P4/E2 é capaz de aumentar a taxa de prenhez

por inseminação em novilhas búfalas, e que o melhor intervalo entre a indução de puberdade e o início de protocolo de IATF é de 45 dias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse estudo é quantificar a eficiência reprodutiva de novilhas búfalas pré-púberes ao final da estação de monta, após um protocolo de indução de puberdade seguido de um protocolo de IATF, ambos à base de P4/E2.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos

- Comparar a prenhez por inseminação (P/IA) das fêmeas que tiveram um intervalo de 45 ou 12 dias entre o fim do protocolo de indução da puberdade e o início do protocolo de IATF;
- Comparar a taxa de prenhez ao repasse do touro nas novilhas submetidas aos diferentes tratamentos de indução de puberdade;
- Comparar a eficiência reprodutiva das novilhas submetidas aos diferentes tratamentos de indução de puberdade, ao final da estação de monta.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Início da vida reprodutiva de novilhas

A puberdade na fêmea pode ser definida como o período em que se estabelece a primeira ovulação, com a formação de um corpo lúteo (VALE; RIBEIRO, 2005). Dessa forma este evento tem sido classificado como o primeiro período de estro, seguido por ovulação ou início da ciclicidade reprodutiva (WILTBANK; KASSON; INGALLS, 1969).

A puberdade não está associada somente com o desenvolvimento anatômico completo do corpo, mas é expresso sempre que o funcionamento fisiológico de algumas glândulas endócrinas se torna completo, juntamente com o alcance mínimo do desenvolvimento estrutural do trato reprodutivo feminino (VALE, 1994; VALE *et al.*, 1990).

Após o nascimento das bezerras, as concentrações séricas do hormônio luteinizante (LH) diminuem. A partir da 10<sup>a</sup> semana de vida, observa-se um aumento gradativo na secreção de LH, se estendendo até a 22<sup>a</sup> semana, quando ocorre decréscimo na secreção de LH, caracterizando uma segunda fase de contenção da atividade gonadal (EVANS *et al.*, 1992). Ao final deste período há um aumento na produção de GnRH assim como um aumento da resposta hipofisária. Essa liberação de gonadotrofinas estimula o desenvolvimento das gônadas, fato este que aumenta as concentrações circulantes de estradiol. A aquisição da capacidade reprodutiva ocorre após a diminuição do efeito do feed-back negativo ao estradiol, com uma subsequente liberação de teores suficientes de LH, capazes de estimular um maior desenvolvimento folicular e ocasionar a primeira ovulação. Em novilhas esses eventos ocorrem no período peripuberal (DAY; ANDERSON, 1998).

Nas novilhas bubalinas, o início da puberdade pode ser considerado quando os níveis plasmáticos de progesterona atingem valores superiores a 1,5 ng/mL, em dois ciclos estrais consecutivos (TERZANO; BARILE; BORGHESE, 2012).

### 3.1.1 Fatores que influenciam no surgimento da puberdade

#### 3.1.1.1 Nutrição e Genética

As búfalas geralmente alcançam a puberdade quando atingem aproximadamente 60% do peso adulto das fêmeas do rebanho (250 a 400 quilos (Kg), mas a idade na qual ocorre o desencadeamento da puberdade pode ser altamente variável, podendo ocorrer entre os 18 a 46 meses (DROST, 2007).

O principal fator que influencia a idade da puberdade é o nível nutricional (BORGHESE *et al.*, 1993, 1994, 1996; TERZANO *et al.*, 1996). TERZANO *et al.* (2007) demonstraram que não há atraso na idade da puberdade dos animais, desde que o ganho médio diário não estivesse abaixo de 600 gramas de peso vivo por dia (g/dia), tanto em sistemas de pastejo ou criação intensiva.

A puberdade tardia é um dos principais fatores que contribuem para as perdas econômicas. A má nutrição provoca ciclos estrais anormais, reduzindo a taxa de concepção e reduzindo o peso ao nascimento, enquanto os procedimentos que antecipam o estro ovulatório em novilhas pré-púberes irão melhorar taxas reprodutivas e acelerar o progresso genético (BORGHESE; TERZANO; MAZZI, 2011).

Os mecanismos de atuação dos fatores nutricionais sobre o desencadeamento da puberdade são múltiplos, podendo ocorrer várias interações entre a disponibilidade dos nutrientes, com o genótipo, peso, escore de condição corporal, idade e composição corporal dos animais (COLLIER *et al.*, 2006, ROBINSON *et al.*, 2006). Segundo Marson; Guimarães; Miranda Neto (2004), o peso, o escore de condição corporal e o ganho de peso diário são ferramentas importantes para auxiliar na predição da idade à puberdade, e também para identificar animais com bom potencial para o início da atividade cíclica e garantir um maior sucesso da estação reprodutiva.

Em 120 novilhas bubalinas, Borghese *et al.* (1994) observaram uma idade média de puberdade de 623 dias e peso médio de 390 Kg. Os autores sugeriram que, em novilhas bubalinas, o início da atividade cíclica ovariana depende do peso. Os búfalos geralmente apresentam ciclos normais de estro quando atingem 2/3 de seu peso corporal adulto. No

entanto, estudo mais recente demonstrou maior retorno econômico quando o peso de 50 a 57% do peso adulto foi utilizado como parâmetro para início da atividade reprodutiva (ENDECOTT *et al.*, 2013).

Estratégias para acompanhamento e melhoria no ganho de peso dos animais também contribuem para adiantar o início da vida reprodutiva em novilhas, visto que diversos autores observaram que o aumento no ganho de peso antes do desmame, ou logo após o desmame, antecipou a idade à puberdade em novilhas (YELICH *et al.*, 1996; HALL *et al.*, 1997; LAMMERS; HEINRICHS; KENSINGER, 1999; ROBERTS *et al.*, 2009), assim como aumentou as taxas de concepção ao primeiro serviço (FLECK; SCHALLES; KIRACOFÉ, 1980; BUSKIRK; FAULKNER; IRELAND, 1995), a produção leiteira (FERRELL, 1982; BUSKIRK *et al.*, 1995) e o peso dos bezerras ao desmame (FERRELL, 1982). Da mesma forma, a diminuição do ganho de peso, devido à restrição alimentar, ocasionou atraso na idade à puberdade (PATTERSON *et al.*, 1992; BERGFELD *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 2009).

Rafiq *et al.* (2008) relataram que o início do primeiro estro em novilhas bubalinas Nili-Ravi ocorreu com peso corporal de 388 a 431 Kg. Em um estudo feito em novilhas Murrah (raça comparável à Nili-Ravi em peso e fisiologia), Haldar; Prakash (2005) relataram que as novilhas alimentadas individualmente com dieta à base de concentrado e volumoso para proporcionar ganho de peso de 400 g/dia, atingiram a puberdade em uma idade média de 946 dias (31,53 meses) com um peso corporal de 380,67 kg.

Borguese *et al.* (1996) alimentaram as novilhas com duas dietas (baixo ou alto nível de energia) para novilhas de nove meses de idade. Novilhas com alta energia na dieta atingiram a puberdade um mês antes (24,5 meses de idade) do que as novilhas criadas com dieta de baixa energia (25,5 meses de idade).

Recentemente, White; Kasimanickam (2016), observaram que novilhas com maior escore de condição corporal (> 5, escala de 1 a 9) apresentaram maior taxa de prenhez (58,9%) quando comparadas às novilhas com menor escore de condição corporal.

A alimentação adequada torna-se necessária para a sinalização metabólica de uma maior disponibilidade diversos fatores como energia, glicose, IGF-1, insulina e leptina. (YELICH *et al.*, 1996; NOGUEIRA, 2004). A leptina é um hormônio importantíssimo nesse processo. A ação dela sobre a reprodução pode ocorrer de duas maneiras: de forma direta, quando age sobre as gônadas promovendo o aumento na produção de esteroides sexuais, o que foi evidenciado

pelo aumento no tamanho uterino, em razão da maior proliferação glandular no epitélio e endométrio uterino; e de forma indireta, por meio da sua ação sobre o eixo hipotalâmico hipofisário-gonadal, cuja função é informar sobre o estado nutricional, permitindo que os mecanismos reprodutivos sigam em frente quando houver reservas energéticas suficientes para a reprodução, caso contrário, este fenômeno é temporariamente bloqueado (BARASH *et al.*, 1996).

A deposição de gordura corporal é outro sinalizador nutricional, sendo diretamente relacionada com a idade à puberdade (SPICER, 2001; VAICIUNAS *et al.*, 2008). Além disso, animais com maior deposição de gordura na garupa apresentaram maior desenvolvimento do trato reprodutivo (LEAFLET *et al.*, 2001). Porém, alguns estudos realizados com ratos (BRONSON, 1987) e com novilhas (BROOKS *et al.*, 1985) demonstraram que a puberdade não está relacionada diretamente com uma porcentagem constante de gordura corporal. Desta forma, é improvável que o tecido adiposo, por si só, seja o elo entre o status nutricional e secreção de LH. O mais provável é que numerosos mecanismos estejam envolvidos e que alterações metabólicas decorrentes das flutuações nutricionais, com consequente alteração na gordura corporal, regulem a liberação pulsátil de LH.

O aporte nutricional e o ganho de peso adequados são responsáveis pela ativação e manutenção dos ciclos estrais normais nessa categorial animal. Diante disto, um correto manejo alimentar é necessário para que haja condições favoráveis ao início da atividade reprodutiva em novilhas, visto que a restrição alimentar leva ao atraso no início da puberdade através da supressão da pulsatilidade de LH e aumento do feedback negativo ao estradiol, ocasionando diminuição no desenvolvimento folicular e impossibilitando a ovulação (YELICH *et al.*, 1996; DAY; ANDERSON, 1998; WETTEMANN; BOSSIS, 2000).

Um estudo recente com novilhas Nelore (n = 650) demonstrou a relação entre a maturação corporal na puberdade e a taxa de prenhez à IATF, foram avaliadas quanto ao escore de condição corporal (escala 1-5), altura da cernelha, profundidade do tórax, espessura da gordura subcutânea e a presença de um corpo lúteo. Os resultados indicaram que tanto a puberdade quanto a resposta à sincronização do estro-IATF em novilhas Nelore jovens são dependentes da aquisição de tecido adiposo subcutâneo suficiente para sustentar a função reprodutiva, os autores concluíram que novilhas selecionadas e manejadas nutricionalmente para maturação corporal podem atingir uma taxa de prenhez para IATF por volta dos 14 meses de idade (FREITAS *et al.*, 2021).

A puberdade é um processo transitório cujas transformações fenotípicas, fisiológicas e comportamentais são influenciadas pelo genótipo e por fatores ambientais (PLANT, 2015; ABDEL-RAOUF, 1960) O genótipo afeta a idade da puberdade, pois algumas raças são anteriores a outras. Nos bovinos, as raças europeias atingem a puberdade antes dos zebuínos, Da mesma forma, as porcas da raça chinesa Meishan atingem a puberdade por volta dos 115 dias de idade, mais precocemente que as raças brancas.

Na novilha, embora exista a dependência de uma idade mínima para a primeira ovulação relacionada ao ganho de peso, do nascimento à puberdade, fatores genéticos e ambientais também influenciam a idade à puberdade (PATTERSON *et al.*, 1992). O produtor que tem como meta emprenhar as novilhas com idade aproximada de um ano, para que o primeiro parto ocorra aos dois, deve inserir em sua propriedade uma associação de medidas, dentre elas estão a forma de manejo, nutrição oferecida e seleção genética (ROCHA; LOBATO, 2002). A seleção genética das fêmeas para precocidade, associada a uma boa alimentação desde o nascimento, determina a eficiência das novilhas em ficar prenhe aos 24 meses de idade.

De acordo com Eler *et al.* (2010), em relação às características reprodutivas, mais especificamente a puberdade, a maioria dos programas genéticos ainda não avançou o suficiente. Os autores afirmaram que o progresso genético poderia ser maior se a idade ao primeiro parto fosse adotada como principal critério de seleção, sendo uma característica promissora para avaliar a precocidade de novilhas e de alta herdabilidade.

A proporção de novilhas púberes aos 18 meses de idade é influenciada pelo pai da novilha, de modo que o mesmo transmite a característica de precocidade para suas filhas. Ao final da primeira estação de monta, a proporção de novilhas ciclando aos 18 meses variou de 58,8% até 0%, mostrando uma necessidade de identificar os touros com o melhor potencial de gerar filhas que apresentem puberdade precoce (NEPOMUCENO, 2013).

Em bubalinos a estimativa de herdabilidade ( $h^2$ ) para idade ao primeiro parto encontrada na raça Murrah foi de 0,24, inferior ao valor de 0,62 encontrado por Penchev (1998), para a mesma raça, na Bulgária. Em ambos os casos, esta característica responderia a um programa de seleção.

Taneja (1999) relata que há grande variação na idade ao primeiro parto (IPP) entre as raças bubalinas criadas nos trópicos, especialmente quando se consideram as condições de manejo. O autor afirma que a estimativa de herdabilidade para IPP nas raças Surti e Bhadawar

foi semelhante à herdabilidade estimada para as raças Murrah e Jafarabadi. As grandes diferenças de manejo diluíram as influências genéticas no rebanho, no entanto, para melhorar o índice da IPP, bastaria uma melhora nas condições de manejo.

### 3.1.1.2 Efeito touro

O efeito touro é um fator ambiental que pode ter efeito positivo sobre o percentual de novilhas que iniciam a estação reprodutiva. O efeito touro, também chamado de bioestimulação, tem sido estudado como alternativa para antecipar a idade à puberdade. Este consiste na manutenção do macho entre as fêmeas antes da estação de monta, para estimular a atividade reprodutiva pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal (QUADROS; LOBATO, 2004), sendo esse estímulo mediado fisicamente por feromônios (CHENOWETH, 1983).

As fêmeas dos mamíferos, especialmente as que vivem em grandes grupos, são envolvidas em um ambiente social muito rico e complexo, cheio de estímulos sensitivos provenientes dos demais componentes do grupo, de suas crias e potenciais parceiros sexuais. Quando percebidos, estes estímulos desencadeiam mudanças em muitos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo aqueles relacionados à reprodução (MARTIN, 2002). A separação de machos e fêmeas, formando grupos distintos nos sistemas de criação como regra de manejo, pode ter suprimido o “efeito do macho”, presente em comunidades. Assim, o reagrupamento dos sexos em períodos estratégicos pode ser vantajoso no sentido de maximizar o desempenho reprodutivo, uma vez que as novilhas concebem mais cedo no seu primeiro acasalamento e, portanto, vêm a parir nos primeiros dias da estação de nascimento do ano seguinte (LESMEISTER *et al.*, 1973).

Ao avaliar a influência do efeito macho sobre a taxa de prenhez em novilhas da raça Nelore constataram aumento significativo na taxa de prenhez dos animais testados, este resultado foi possível pois a presença do macho quando aproxima-se a puberdade favorece o desbloqueio da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, no qual as novilhas bioestimuladas passam a apresentaraios precocemente, o que possibilita maior taxa de prenhez ao final da estação de monta. (SOARES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em búfalos também há registros de efeitos positivos do efeito macho. Um estudo de Gokuldas *et al.* (2010) verificou um intervalo mais curto para a retomada da ciclicidade ovariana no pós-parto para búfalas expostas à bioestimulação. Quando comparadas às não expostas, reduz-se a incidência de ovulação silenciosa e melhora-se a primeira taxa de concepção. Esses resultados concordam com os relatos de Abdalla (2003), também em búfalos.

Barman *et al.* (2011) descreveu que o efeito macho provavelmente influenciou a competência de desenvolvimento de oócitos. Competência de desenvolvimento é termo usado para definir a capacidade de um oócito de obter sucesso em uma fertilização e desenvolvimento, pelo menos ao longo do período de pré-implantação (SIRARD, 2001). É bem definido que oócitos que foram expostos a um estímulo de gonadotrofina são mais competentes ao desenvolvimento embrionário seguido de fertilização (CHILD *et al.*, 2001). Portanto, é sugestivo que a técnica da bioestimulação pode melhorar os mecanismos de ovulação e luteinização, melhorando assim o desenvolvimento dos oócitos de búfalas. Em resumo, a exposição de um touro bubalino vasectomizado no pós- parto reduz a incidência de ovulação silenciosa e melhora a taxa de concepção.

### 3.1.2 Antecipação da puberdade

#### 3.1.2.1 Indução hormonal

A precocidade sexual, avaliada por meio da idade à puberdade ou idade ao primeiro parto, constitui um dos parâmetros mais confiáveis quando se deseja mensurar e elevar a eficiência reprodutiva do rebanho, pois expressa, em linhas gerais, o melhor índice para avaliação da fertilidade inerente a uma fêmea.

A hormonioterapia quando bem aplicada, pode melhorar substancialmente a eficiência reprodutiva de novilhas. Vários protocolos já foram testados e utilizados nos últimos anos, com metodologias distintas (ANDERSON *et al.*, 1996; RASBY *et al.*, 1998; VOGG *et al.*, 2004). Distintas substâncias hormonais também são utilizadas para induzir a puberdade em novilhas e, desta forma, aumentar a eficiência reprodutiva destes animais (RASBY *et al.*, 1998; VOGG

*et al.*, 2004; BRAGANÇA *et al.*, 2004). Foi relatado que o crescimento folicular pode ser induzido com o emprego de diferentes hormônios tais como a progesterona, o estradiol e a combinação destes, e com o GnRH e seus análogos (THATCHER *et al.*, 2001).

#### 3.1.2.1.1 Indução com progesterona (P4)

Existem na literatura vários estudos utilizando progesterona ou progestágenos (TANAKA *et al.*, 1995; HALL *et al.*, 1997; RASBY *et al.*, 1998; LUCY *et al.*, 2001; GREGORY; ROCHA, 2004; SÁ FILHO *et al.*, 2015).

A habilidade dos progestágenos na indução da puberdade está relacionada primariamente à maturidade do sistema neuroendócrino e a via de regulação da secreção de LH. Esse mecanismo se dá pela redução da expressão dos receptores hipotalâmicos de estradiol e do *feedback* negativo exercido pelo mesmo nos neurônios secretores de GnRH (DAY; ANDERSON, 1998). Deste modo, a gradativa redução da sensibilidade do hipotálamo aos efeitos inibitórios do estradiol, propicia um aumento na frequência de liberação dos pulsos de LH (MARSON *et al.*, 2004). Essa redução do *feedback* negativo ao estradiol ocorre pela diminuição na concentração de seus receptores citoplasmáticos na porção anterior do hipotálamo, no hipotálamo médio basal e na hipófise anterior (DAY *et al.*, 1987, KINDER *et al.*, 1987, KINDER *et al.*, 1995). A presença de estradiol modula genes relacionados ao controle metabólico do hipotálamo anterior, afetando direta ou indiretamente os neurônios GnRH.

De acordo com Azeredo *et al.* (2007) a utilização de protocolos hormonais em novilhas com intuito de induzir e sincronizar o estro teve resultados positivos, pois a progesterona, quando utilizada em novilhas, inclusive pré-púberes, é capaz de iniciar a atividade ovariana cíclica. A progesterona vai atuar como indutora nesse processo de antecipação da puberdade, que é o principal objetivo para a eficiência reprodutiva (PFEIFER *et al.*, 2009).

Outro viés importante na indução de puberdade por progesterona está relacionado aos efeitos de dose e de tempo de exposição ao hormônio. O emprego de altas doses de progesterona nas novilhas pode levar a uma diminuição da pulsatilidade de LH, comprometendo o

crescimento folicular, a ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2007), o estro e o pico pré-ovulatório de LH (RAWLINGS *et al.*, 2003).

Nesse sentido, os implantes intravaginais de progesterona vêm sendo amplamente reutilizados nos protocolos de IATF, visando reduzir as concentrações circulantes de progesterona liberadas dos implantes, assim como obter um melhor custo-benefício para o produtor. Um estudo de Baruselli *et al.* (2006) aponta que a reutilização de implantes intravaginais reduz custos de um programa de indução de puberdade e IATF na espécie bovina e, portanto, é uma prática válida para que cada vez mais as biotecnologias tenham bons resultados e garanta a eficiência reprodutiva nos rebanhos brasileiros.

Um estudo de Sá Filho *et al.* (2015) demonstrou que o tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona associado à administração de estradiol é eficiente para aumentar o número de novilhas de corte com corpo lúteo no início do período reprodutivo. Este estudo comparou a P/IA dos seguintes grupos: controle; grupo tratado apenas com dispositivo intravaginal de P4; grupo tratado com dispositivo intravaginal de P4 associado à benzoato de estradiol no momento da retirada do implante; grupo tratado com dispositivo intravaginal de progesterona associado à cipionato de estradiol no momento da retirada do implante. O estudo concluiu que a associação de P4+E2 é mais eficiente que apenas a ação da progesterona isolada, bem como concluíram que a associação de cipionato de estradiol à progesterona é mais eficiente que a associação com benzoato de estradiol.

Em outro estudo com indução da puberdade de novilhas pré-púberes, CADIMA (2018) avaliou taxa de concepção, taxa de prenhez e os resultados finais da estação de monta em novilhas Nelore, com idade variando de 22 a 26 meses. Os animais que responderam à indução tiveram taxa de concepção de 64,71% (11/17) na primeira inseminação artificial, e para os que não responderam, a taxa de concepção foi de 50% (3/6), o que demonstra uma ação positiva da indução de ciclicidade na resposta aos protocolos de IATF. Ao final da estação de monta a taxa de prenhez dos animais que responderam à indução foi de 76,47% (13/17) e os animais que não responderam se mantiveram com 50% no fim dos manejos reprodutivos.

Em búfalas, estudos nessa vertente também foram realizados (SAINI *et al.*, 1988; HONNAPPAGOL; PATIL, 1991; ANDURKAR; KADU, 1995; ZICARELLI *et al.*, 1997). Um

estudo de Barile *et al.* (2001) demonstrou resultados satisfatórios em novilhas búfalas pré-púberes, sob mesma nutrição e manejo, induzidas com dispositivo intravaginal de progesterona.

#### 3.1.2.1.2 Indução com melatonina

A melatonina é uma substância natural presente no organismo de todos os mamíferos e de quase todos os vertebrados, sintetizada pela glândula pineal, durante o período noturno, a partir do triptofano e da serotonina (TRALDI *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2014). Como a melatonina é produzida durante o período noturno, a sua secreção varia com a duração do dia e da noite, sendo que é a duração dessa secreção que vai regular a atividade do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal. A molécula da melatonina é a N-acetil-5-metoxitriptamina, sintetizada durante a fase escura do fotoperíodo que transfere uma informação para sincronizar a fisiologia da célula com a parte escura e a parte clara do ciclo dia-noite.

Em outras espécies que são categorizadas como espécies de dias curtos, à exemplo de caprinos e ovinos, um aumento na secreção de melatonina irá estimular a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) a partir do hipotálamo. Em animais considerados de dias longos, como os equinos, o aumento da exposição à melatonina tem ação reversa, inibindo a secreção do GnRH. Deste modo, as diferenças no fotoperíodo são classificadas como sinais capazes de ligar ou desligar a atividade sexual de forma específica de acordo com a espécie. (SRINIVASAN *et al.*, 2009)

Outros estudos têm sugerido também uma atuação da melatonina na fisiologia ovariana, através da detecção de altas concentrações de melatonina no fluido folicular (RONNBERG *et al.*, 1990). Também foram identificados receptores de melatonina nas células foliculares de camundongas (SOARES *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2001), estes eventos sugerem uma possível produção de melatonina no ovário. Sua atuação bem descrita como antioxidante pode estar associada ao desenvolvimento folicular e à qualidade oocitária, tendo influência em processos como a maturação oocitária e a ovulação (TAMURA *et al.*, 2008).

Segundo Planski *et al.* (2017), um aumento da concentração de melatonina vai estimular a secreção de GnRH e de LH, fundamental para o desenvolvimento folicular, para a ovulação e para a formação do corpo lúteo ao nível dos ovários. Deste modo, por meio da aplicação de melatonina exógena, é possível criar uma resposta semelhante à existente na época de fotoperíodo decrescente. E é esta melatonina incluída na sequência de processos que leva ao início da puberdade.

Os implantes de melatonina foram aplicados com sucesso para a estimulação do ovário e ciclicidade em novilhas de corte e búfalas em anestro (GHUMAN *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; RAMADAN *et al.*, 2014). Ghuman *et al.*, (2008) também realizaram estudos induzindo a puberdade em novilhas búfalas através de implantes de melatonina (18mg), obtendo a ovulação de animais submetidos ao protocolo.

Este sucesso no uso de implantes de melatonina vai de acordo com os resultados de diferentes investigações em novilhas de corte (TORTONESE; INSKEEP, 1992; JAEGER *et al.*, 1998) e novilhas bubalinas em anestro (SINGH *et al.*, 2010). Além disso, 20% das novilhas tratadas apresentavam nível hormonal abaixo da referência. Pode se aceitar que a administração de implantes de melatonina está ligada a uma tendência para o início mais precoce da atividade ovariana (80% vs. 100%) (TORTONESE; INSKEEP, 1992).

Em novilhas búfalas em anestro, outros autores também estudaram o efeito de melatonina exógena aplicada para a aceleração da puberdade ou indução de ciclicidade ovariana, e relataram indução bem-sucedida da atividade ovariana pela administração de implantes de melatonina (BORGUESE *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1998; GHUMAN *et al.*, 2007, 2010; SINGH *et al.*, 2010).

### 3.1.2.1.3 Indução com hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina recombinante bovina (rbST)

A somatotropina bovina (bST), ou hormônio de crescimento (GH), é um hormônio somatotrófico, secretado pelo lobo anterior da hipófise na circulação, o qual se liga a receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o crescimento (HERRINGTON; CARTER-SU, 2001).

Entre seus principais efeitos constam a estimulação na síntese de proteína e glicose, a oxidação de gordura e a inibição na utilização da glicose por tecidos periféricos (MACEDO *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm revelado a importância deste hormônio durante o desenvolvimento folicular (HUTCHINSON *et al.*, 1988; GONG *et al.*, 1997; SIROTKIN; MAKAREVICH, 2002). Os IGFs (IGF-I e IGF-II) podem ser produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo. Por não existir um órgão de armazenamento, a secreção destes fatores ocorre à medida que eles são produzidos (YAKAR *et al.*, 2002). No ovário, o IGF-I possui sua origem nas células da granulosa e tem como principal função estimular o desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral (ARMSTRONG; BENOIT, 1996).

Os efeitos do GH no ovário podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos indiretos estão relacionados à atuação do IGF-I, já que o GH estimula a liberação deste fator, enquanto os efeitos diretos estão relacionados com a expressão para os receptores de GH (R-GH) que foram detectados em ovários humanos (SHARARA; NIEMAN, 1994).

Em grande parte das espécies, o GH e o IGF-I parecem não ser necessários para a ativação folicular, entretanto, eles atuam promovendo o crescimento de folículos secundários e a formação de antro. O GH atua melhorando o desenvolvimento folicular, principalmente na fase antral inicial e estimula a maturação oocitária, enquanto o IGF-I auxilia na esteroidogênese e na proliferação das células da granulosa, bem como no crescimento oocitário.

Segundo Ojeda e Jameson (1977) as concentrações circulantes de GH aumentam rapidamente durante o desenvolvimento puberal. Outros estudos também relatam que o fator de crescimento semelhante à insulina-1 aumenta durante o período pré-púbere em novilhas *Bos Taurus* (GRANGER *et al.*, 1989; YELICH *et al.*, 1995). Um atraso na puberdade tem sido associado à deficiência de GH exógeno tanto em humanos quanto em ratos (SHEIKHOLISLAM; STEMPFE, 1986; RAINALEY; PHARES, 1980).

O tratamento de novilhas com GH exógeno foi associado ao aumento da concentração circulante de IGF-1 e ao início mais precoce da puberdade (COOKE *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 1994). O fator de crescimento semelhante à insulina 1 estimulou a proliferação de células de granulosa e atua sinergicamente com FSH para promover sua atividade em termos de síntese de proteínas e esteróides em búfalos (PAWSHE *et al.*, 1998).

Um estudo de Darweish *et al.* (2016) utilizou somatotropina recombinante bovina (rbST) associada com GnRH e obteve uma maior taxa de resposta ao estro em novilhas bubalinas tratadas com rbST-GnRH em comparação com novilhas tratadas isoladamente com GnRH ou sem tratamento, e provou o efeito benéfico do rbST como co-tratamento com GnRH na indução da puberdade em novilhas búfalas. A possível explicação pra isso é que no grupo tratado com rbST, o aumento coexistente na concentração sérica de IGF-1 com o aumento tanto na população folicular quanto no tamanho do maior folículo sugere que o efeito estimulador de rbST na dinâmica folicular é pensado para ser mediado pelo aumento no nível de tal hormônio metabólico que finalmente impactou no início da puberdade no grupo tratado com rbST-GnRH.

Esses resultados estão de acordo com Cooke *et al.* (2013); Hall *et al.* (1994) em novilhas de corte. Além disso, Haldar; Prakash (2006) concluíram que o aumento da concentração plasmática de GH, em resposta ao tratamento com fator de liberação do hormônio de crescimento (GRF) em novilhas bubalinas, induziu puberdade precoce.

#### 3.1.2.1.4 Intervalo entre a indução e o primeiro serviço

Segundo Byerley *et al.* (1987), novilhas cobertas no primeiro estro espontâneo possuem menor fertilidade em comparação às novilhas cobertas em seu terceiro estro. Eles avaliaram se a taxa de prenhez difere em novilhas cobertas (monta natural) no primeiro ou terceiro estro da vida reprodutiva. A fertilidade das novilhas cobertas no primeiro estro foi menor do que as novilhas cobertas em seu terceiro estro (57,0% vs. 78,0%).

Um outro estudo de Romano (1997) também evidenciou que, em novilhas, a maturidade sexual é atingida pela ocorrência de três ciclos estrais consecutivos completos, em intervalos regulares acrescidos dos sinais externos de comportamento de estro. Como já foi discutido, a progesterona pode antecipar a puberdade, uma vez que reduz o *feedback* negativo do estradiol no hipotálamo, pela redução do número de receptores para estradiol (DAY *et al.*, 1984), o que confirma a necessidade de exposição do trato reprodutivo à progesterona para que os primeiros ciclos estrais férteis possam ocorrer.

Corroborando estes dados, um estudo de Reis *et al.* (2012) comparou dois intervalos entre a indução de puberdade (P4+E2) e o início da estação reprodutiva (ER) (90 ou 45 dias), e concluiu que a indução de puberdade, tanto aos 90 quanto aos 45 dias antes do início da ER aumenta, semelhantemente, as taxas de ciclicidade e de prenhez em novilhas Nelore submetidas a IATF.

Mais recentemente, Rodrigues *et al.* (2014) avaliaram três diferentes intervalos entre final do protocolo de indução (P4+E2) e início do protocolo de IATF (10, 12 ou 14 dias). As novilhas que foram sincronizadas com intervalo de 12 ou 14 dias apresentaram maior prenhez do que aquelas com intervalo de 10 dias entre a indução e a IATF (36,4%, 51,8% e 45,5% para 10, 12 e 14 dias, respectivamente). Os autores associaram a maior fertilidade devido ao momento da luteólise espontânea durante o protocolo de IATF, o que criou um maior período com menores concentrações de progesterona durante o protocolo, levando ao aumento na frequência de LH e no crescimento do folículo dominante. Além disso, este modelo permite aos técnicos fazerem a aplicação de PGF2 $\alpha$  somente no dia 9 do protocolo (KINDER *et al.*, 1996), reduzindo o número de manejos (protocolo de 3 manejos).

Estes estudos foram cruciais para o embasamento do delineamento experimental de intervalos entre a indução de puberdade e a IATF neste trabalho, com o objetivo de esclarecer qual seria o intervalo ideal para a espécie bubalina.

## **3.2 IATF e eficiência reprodutiva**

### **3.2.1 Uso da IATF**

A IATF vem sendo amplamente utilizada por trazer inúmeros benefícios para o produtor, principalmente sua contribuição com o melhoramento genético. Além disso, a possibilidade de induzir a ciclicidade em animais que estão em anestro aumenta a eficiência reprodutiva (VIANNA *et al.*, 2008; TAIRA *et al.*, 2010).

Inicialmente, Pursley *et al.* (1995) propuseram um método de sincronização que consiste na primeira administração intramuscular de GnRH, sem levar em conta o período do ciclo estral. O tratamento com GnRH induz a ovulação do folículo dominante, quando presente no momento do tratamento, promovendo o início sincronizado de uma nova onda de crescimento folicular. Após sete dias é realizado o tratamento com prostaglandina, com a finalidade de regredir o corpo lúteo (CL) presente. Se esse CL for decorrente do tratamento inicial de GnRH, ocorrerá tempo suficiente para responder ao agente luteolítico. Uma segunda dose de GnRH é administrada 48 horas após a PGF, com a finalidade de promover a ovulação sincronizada do folículo dominante. A inseminação artificial é realizada 16 a 18 horas após o último tratamento hormonal, sem a necessidade de detecção do estro. Esse protocolo ficou conhecido como *Ovsynch*.

Baruselli *et al.* (1999) estudaram a eficiência do protocolo *Ovsynch* em búfalas com 45-60 dias pós-parto. Verificaram uma taxa de concepção de 50,2% entre 261 búfalas tratadas. Os autores concluíram que a técnica é viável em bubalinos. Em outro estudo, Baruselli (2001) avaliando a eficiência do protocolo *Ovsynch* em búfalas acima de 60 dias pós-parto, obteve taxa de prenhez de 66,9%, ratificando o primeiro estudo.

Baruselli *et al.* (2003) demonstraram que houve diferença na taxa de prenhez em búfalas quando utilizado o protocolo *Ovsynch* em estações diferentes do ano, apresentando 48,8% (472/967) na estação reprodutiva favorável – outono/inverno e 6,9% (6/86) na estação reprodutiva desfavorável – primavera/verão. Esse resultado é indicativo de que, mesmo com estimulação hormonal exógena utilizando GnRH e PGF<sub>2α</sub>, as búfalas em anestro estacional não respondem ao protocolo *Ovsynch* adequadamente (BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009).

Os protocolos de sincronização da ovulação para IATF utilizados no Brasil e na América do Sul são principalmente aqueles que utilizam como base o uso de progestágeno mais estradiol (P4+E2) (BISINOTTO *et al.*, 2013). Um trabalho de Barile *et al.* (1996) em vacas bubalinas demonstrou que a sincronização feita com dispositivo intravaginal liberador de progesterona, assim como em fêmeas bovinas, é capaz de controlar a ovulação e induzir uma boa taxa de sincronização.

Um aspecto comum entre tais protocolos de sincronização da ovulação para IATF é a inserção de um dispositivo intravaginal contendo P4, mais administração de benzoato de estradiol (BE; 2mg IM) no dia 0; esse procedimento tem por finalidade a regressão folicular, pois altas concentrações de estradiol na presença de progesterona promovem a regressão folicular e a emergência de uma nova onda de crescimento; administração de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ), no momento da retirada do dispositivo, induzindo a luteólise, ou seja, a quebra do corpo lúteo (P4) pela prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) e mais 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) pois a eCG que se liga aos receptores foliculares de FSH e de LH (STEWART; ALLEN, 1981), estimulando o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em animais que tenham comprometimento na liberação de gonadotrofinas (BARUSELLI *et al.*, 2004.)

Carvalho *et al.* (2007) estudaram a utilização de GnRH como indutor de ovulação para a substituição da gonadotrofina coriônica humana (hCG). Neste estudo, os autores obtiveram taxa de prenhez por inseminação (P/IA) de 51,8%, demonstrando que a utilização de GnRH como indutor de ovulação apresenta resultados satisfatórios na estação reprodutiva desfavorável. Este resultado indica que o GnRH proporciona semelhante P/IA e pode também colaborar para a redução do custo do protocolo. Semelhante taxa de P/IA foi observada quando o GnRH foi substituído por BE como indutor de ovulação, tanto em novilhas quanto em vacas búfalas (CARVALHO *et al.*, 2017).

Posteriormente, esse protocolo à base de P4+BE+eCG+GnRH foi também validado na estação reprodutiva favorável (MONTEIRO *et al.*, 2016), quando boa parte das fêmeas estão ciclando, e ao comparar a eficiência deste protocolo entre as estações reprodutivas favorável e desfavorável (MONTEIRO *et al.*, 2018). Estes estudos demonstraram que as búfalas podem ser submetidas a programas de IATF em qualquer momento do ano, sem comprometimento da eficiência reprodutiva.

### 3.2.2 IATF e eficiência reprodutiva de novilhas

Assim como em vacas, a utilização de novilhas em protocolos de IATF é importante, pois é sempre necessária a reposição de matrizes nos rebanhos, e é interessante que essas

matrizes produzam crias o quanto antes, para a viabilidade do processo produtivo (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Segundo Silveira (2014), a sincronização do estro, recorrentemente, é menos eficiente em novilhas do que em vacas pluríparas. Isso se deve à vários fatores, entre eles o fator fisiológico, que pode dificultar a sincronização da ovulação devido a altos níveis sanguíneos de progesterona. Como consequência, isso leva à menores taxas de concepção, também por influência da idade e o desenvolvimento inadequado na primeira estação reprodutiva. Outro estudo também atestou que os níveis de progesterona durante o ciclo são um importante fator de influência na reprodução. Em um estudo de Wheaton; Lahn (2007), um dispositivo intravaginal de progesterona combinado com benzoato de estradiol ou cipionato de estradiol causou atresia do folículo dominante.

No entanto, um estudo de Sá Filho *et al.* (2015) utilizou vinte e sete novilhas pré-púberes de corte Nelore de 20 a 22 meses de idade, que foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de tratamento: um grupo controle com novilhas não tratadas (n=8); um segundo grupo que foi chamado de PI que recebeu um implante intravaginal contendo 1,9 g de P4 por 10 dias; um terceiro grupo chamado de UPI que recebeu um implante intravaginal que já havia sido utilizado previamente por três períodos de 8 dias, totalizando 24 dias de uso, também por 10 dias. Os resultados encontrados no estudo apontaram maior resposta ovulatória (P = 0,04) em novilhas tratadas com implantes intravaginais de progesterona [PI = 30,0% (3/10) e UPI = 55,6% (5/9)] do que as não tratadas [Controle = 0,0% (0 / 8)]. Ambos os grupos tratados com P4 sustentaram a concentração plasmática de P4 acima de 1 ng/mL pelo menos durante os primeiros 7 dias do tratamento. No Dia 20, a concentração plasmática de P4 era maior (P < 0,0001) nas novilhas tratadas com UPI ( $1,38 \pm 0,45$  ng / mL) do que nas novilhas Controle ( $0,18 \pm 0,07$  ng / mL), demonstrando maior eficiência dos implantes utilizados previamente em novilhas.

Sá Filho *et al.* (2010), utilizando 177 novilhas Nelore, verificaram a presença ou ausência de um corpo lúteo (CL) antes do protocolo de IATF e qual o impacto da ciclicidade nos resultados do protocolo. O estudo mostrou que a taxa de crescimento do folículo dominante, entre o momento da remoção do implante de P4 até a IATF [ $0,6 \pm 0,1$  vs.  $1,1 \pm 0,1$ ; (P = 0.0009)] e o diâmetro do CL 5 dias após IATF [ $13,8 \pm 0,3$  vs  $15,5 \pm 0,3$ ; (P = 0.0002)] foram maiores em novilhas com CL do que em novilhas sem CL no Dia 0 do protocolo. Novilhas com CL no Dia 0 também tiveram mais P/IA quando comparadas com novilhas sem CL [60.3 % (35/58)

vs 37.0 % (10/27); (P = 0,02)] respectivamente, reafirmando o quanto este é um fator de influência na eficiência reprodutiva das novilhas.

Um outro fator que exerce influência na eficiência dos protocolos em novilhas é o temperamento. Esta categoria animal tende a ser mais agitada, principalmente quando criada em sistema extensivo (FUJITA *et al.*, 2013).

Apesar desses fatores, é importantíssimo mencionar a importância desta categoria e de estudos para garantir que estes animais sejam eficientes do ponto de vista reprodutivo e produzam bezerros o mais cedo possível, pois é isso que vai gerar lucro para o produtor e é o objetivo da linha de produção. As novilhas exercem forte influência na eficiência reprodutiva, visto que estas, quando alcançam o objetivo e emprenham mais cedo, além de aumentar a eficiência, diminuindo a idade ao primeiro parto, têm maior possibilidade de ficarem prenhes na próxima estação, quando primíparas, e poderão apresentar um intervalo entre partos menor (GREGORY; ROCHA, 2004; AZEREDO *et al.*, 2007; GOTTSCHALL *et al.*, 2008; GOTTSCHALL *et al.*, 2009).

Um estudo de Grillo *et al.* (2015) comparou as taxas de prenhez em fêmeas Nelore de diferentes categorias - novilhas (n=150), primíparas (n=150) e multíparas (n=181) - submetidas ao mesmo protocolo de IATF. Foram utilizados no experimento apenas animais cíclicos, sendo consideradas cíclicas todas as fêmeas que apresentaram um folículo (FL) ou um corpo lúteo (CL) em um dos ovários e acíclicas todas as fêmeas que não apresentaram estruturas palpáveis (FL ou CL) ao exame retal, e foram incluídos no estudo apenas fêmeas com escore  $\geq 2,0$  numa escala de 1 a 5. Todos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de sincronização para IATF (D0- 2,0mg de benzoato de estradiol + dispositivo intravaginal com 1,0g de progesterona, D8- retirada do implante + 250 $\mu$ g de cloprostenol sódico+ 300 UI de eCG, D9- 1,0mg Bz. Estradiol, D10- IATF) Os resultados foram taxas de 86,0 % (129/150) para novilhas, 45,3% (41/150) para primíparas e 76,8% (139/181) para multíparas, e não houve diferença estatística entre novilhas e multíparas. Mostrando que é, sim, possível fazer IATF de novilhas de forma eficiente.

Sá Filho *et al.* (2010) também demonstrou a influência da eCG nos protocolos de IATF em 177 novilhas Nelore, comparando o uso de 0 UI (n=87) ou 400 UI (n=90) no momento da remoção do implante de progesterona. Os resultados do estudo demonstraram que novilhas

Nelore tratadas com eCG alcançaram maior ( $P = 0.04$ ) P/IA [50 % (45/90)] do que novilhas sem tratamento com eCG [36.8% (32/87)].

Um estudo com novilhas de diferentes idades obteve uma taxa de prenhez à IATF de 46,7% (14/30) para novilhas de 2 anos de idade utilizando Ovsynch, e também de 46,7% (14/30) para novilhas de 3 anos de idade utilizando o mesmo protocolo (GOTTSCHALL; SILVA, 2012). Silva *et al.* (2005) observaram taxa de prenhez de 52,2% em novilhas Hereford, acasaladas aos 18 meses de idade, e com peso ao início da estação reprodutiva de 286 Kg.

Almeida *et al.* (2010), avaliaram as taxas de concepção e prenhez de 104 novilhas, base racial Hereford e Braford, acasaladas aos 24 meses. O grupo G-IA constituiu-se de 54 novilhas e o grupo G-IATF de 50 novilhas. Dos 50 animais do G-IATF inseminou-se 50 e dos 54 animais do G-IA inseminou-se 28, sobrando 26 que formaram o grupo G-NãoIA. O protocolo utilizado para o G-IA foi o “7+5”, onde nos primeiros 7 dias foram observados os estros e realizada a inseminação 12 horas após a visualização do mesmo, no 7º dia foi aplicado 0,375 mg de cloprostenol sódico pela via intramuscular (IM) nas novilhas não inseminadas, prosseguindo a inseminação por mais 5 dias. O protocolo do G-IATF partiu do dia 0 com a colocação do dispositivo intravaginal, indicado para novilhas, impregnado com 0,558 g de progesterona e a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) (IM). No dia 6,5 os animais receberam 0,375 mg de cloprostenol sódico (IM). No dia 8 foram retirados os dispositivos intravaginais. No dia 9 foi aplicado 1 mg de BE (IM) e no dia 10 a tarde foi realizada a IATF. Sete dias após o término da IATF unificou-se os grupos realizando-se o repasse por 45 dias com touros na proporção de 2,88%. A taxa de concepção do G-IA e G-IATF, foi respectivamente, 39,3% e 38,0% ( $P = 0,05$ ). As taxas de prenhez, ao final da estação de monta para G-IATF, G-IA e G-NãoIA foram, respectivamente, 80,0%, 85,7%, 61,5% resultando em prenhez geral de 76,9%.

Em um estudo recente com búfalas, Carvalho *et al.* (2017) comparou a eficiência reprodutiva de novilhas ( $n=157$ ) e vacas ( $n=354$ ) utilizando benzoato de estradiol ou GnRH como indutor de ovulação, não havendo diferença entre os tratamentos para taxa de prenhez, e a taxa de prenhez não diferiu para vacas (47,5%) e novilhas (42,7%).

### 3.2.3 IATF e eficiência reprodutiva de novilhas pré-púberes

A quantidade de novilhas pré-púberes no início da estação de monta é um dos fatores que impactam a eficiência reprodutiva e longevidade de novilhas (NOGUEIRA, 2004). Neibergs; Reeves (1988) afirmaram que quando se trabalha com novilhas pré-púberes, os índices são desapontadores. Porém, estudos mais recentes apontam as vantagens de se trabalhar com esta categoria, e com resultados animadores.

Utilizando-se a sincronização e a indução do estro e da ovulação nestas novilhas que estão entrando na puberdade, podemos utilizar esta primeira ovulação no protocolo de IATF, mesmo ela sendo de menor fertilidade. Isto também pode contribuir pra antecipação da terceira ovulação das novilhas dentro da estação reprodutiva, de fertilidade reconhecidamente superior em relação à primeira e à segunda (PATTERSON *et al.*, 1990).

Segundo Azeredo (2007), a sincronização e a indução de estros para programas de inseminação artificial em novilhas na primeira estação reprodutiva, visando especialmente à antecipação e à concentração das concepções, proporcionou resultados positivos. Na segunda temporada reprodutiva, a concentração das partições resultou em um maior índice de repetição de crias.

Um estudo de Pfeifer (2009) obteve taxa de prenhez maior ( $P < 0,05$ ) entre novilhas púberes (60,3%; 44/74) que entre novilhas pré-púberes (35,0%; 14/40). Outros estudos concordam que as porcentagens de aparecimento de estros e prenhezes parecem ser maiores quando se utilizam novilhas já cíclicas em comparação àquelas ainda pré-púberes (TIBARY *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1995). Pfeifer *et al.* (2008) e Sá Filho *et al.* (2010), em programas de IATF em novilhas de corte no Brasil, também relataram maiores taxas de prenhez em novilhas já púberes.

Resultado semelhante foi observado mais recentemente, quando comparada a P/IA de novilhas púberes e pré-púberes foram submetidas à IATF. Em estudo com 213 novilhas da raça Nelore, Nonato *et al.* (2019) descreveram taxas de P/IA de 58,52% para as novilhas púberes, o que foi maior do que para as fêmeas pré-púberes (44,87%).

Ao avaliar os efeitos da P4 no desempenho reprodutivo de novilhas pré-púberes, Claro Junior *et al.* (2010) observaram as seguintes taxas de P/IA: 27,3% em animais não tratados com P4, 33,7% em animais tratados com um dispositivo intravaginal no primeiro uso (mais P4) e 46,8% em animais com um dispositivo intravaginal no 4º uso (usado previamente em 3 protocolos de IATF).

Em trabalho com novilhas super precoces, Freitas (2015) observou que novilhas Nelore pré-púberes de 14 meses ovularam em média 73,6% e apresentaram taxa de prenhez à IATF de 35,7%. Nesse estudo, o protocolo de IATF foi capaz de induzir a puberdade e, ao mesmo tempo, garantir prenhez.

Em búfalas pré-púberes, Guimarães (2020) obteve resultados de prenhez à IATF semelhantes aos de bovinos, utilizando 75 novilhas pré-púberes com média de 23 meses de idade, peso médio de  $314,99 \pm 4,54$  Kg e escore de condição corporal  $3,22 \pm 0,04$  (ECC; 1-5). Todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Nos resultados o estudo obteve uma taxa de ovulação de 68% e taxa de prenhez de 22,7% (17/75).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização de experimento

O experimento foi realizado em uma fazenda que fica localizada no município de Tailândia (02°47'02,2" S 48°57'34,8" O), região nordeste do estado do Pará. O experimento teve duração de 6,5 meses, no período de setembro de 2020 à janeiro do ano de 2021.

### 4.2 Características avaliadas e seleção dos animais

Todos os animais foram manejados de acordo com as recomendações da Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (SIPAC: 23084.013121/2019-52).

Dez dias antes do início do experimento (D-65) (Figura 1), foram coletadas informações de desenvolvimento corporal e desenvolvimento reprodutivo. Para o desenvolvimento corporal foram avaliados o peso (Kg) e o escore de condição corporal (ECC). Na avaliação de peso foram utilizadas somente novilhas que pesavam acima de 270 Kg - baseado em estudos envolvendo novilhas bubalinas que demonstravam que as novilhas precisam de um peso mínimo para entrar na puberdade (DROST, 2007; BORGUESE *et al.*, 1994; ENDECOTT *et al.*, 2013). As avaliações de escore de condição corporal foram realizadas sempre pela mesma pessoa, utilizando a escala de 1 (extremamente magra) a 5 (extremamente gorda) (RICHARDS; SPITZER; WARNER, 1986).

Nos momentos D-65 e no dia do início do experimento (D-55), todos os animais foram avaliados por meio de Ultrassom veterinário A5V, (Sonoscape<sup>®</sup>, Shenzhen, China) munido de transdutor linear e frequência 7,5 MHz, para determinar a presença do corpo lúteo ou contratilidade uterina. Todos os animais que apresentaram corpo lúteo ou contratilidade uterina em pelo menos uma das duas avaliações foram considerados púberes e foram excluídos do experimento.

Foram avaliados 180 animais no total, sendo que destes, 28 animais foram excluídos por apresentarem atividade ovariana ou contratilidade uterina em pelo menos uma das duas avaliações (D-65 e D-55).

### 4.3 Animais utilizados

Foram utilizadas 152 novilhas búfalas pré-púberes da raça Murrah, com idade entre 12 e 16 meses, peso entre 270 e 394 kg ( $320,51 \pm 38,00$ ) e ECC ( $2,89 \pm 0,15$ , 1-5), criadas à pasto. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em piquetes de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e Mombaça (*Panicum maximum*) com predominância de Tifton 85, qualidade do pasto muito boa, porém com pouco sombreamento, acesso *ad libitum* a água e suplementação mineral. Os animais do experimento estavam vacinados contra Brucelose (Brucelina B19<sup>®</sup>; Vallée, MSD, São Paulo – SP, Brasil), Clostridiose (Bioclostrigen J5<sup>®</sup>, Curitiba – PR, Brasil) Febre Aftosa (Aftovacin<sup>®</sup> Oleosa, MSD, São Paulo – SP, Brasil) e IBR, BVD + Leptospirose (Cattlemaster<sup>®</sup>; Zoetis, São Paulo - SP, Brasil).

### 4.4 Protocolo de indução de puberdade

No início do protocolo de indução de puberdade, as novilhas tratadas receberam um implante intravaginal liberador de progesterona (P4) de 4<sup>o</sup> uso (Primer<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) previamente utilizado por 27 dias, ou 3 protocolos de IATF em búfalas). Um estudo de Miguez (2011) demonstra que o dispositivo intravaginal de progesterona *in vivo* libera cerca de 31% da progesterona inicial ao longo de 7 dias. Este estudo corrobora com Rathbone et al. (2002) que encontrou uma liberação de progesterona igualmente proporcional através do dispositivo CIDR, diante disto estima-se que o dispositivo de 4<sup>o</sup> uso apresente uma concentração residual de cerca de 10% da sua concentração inicial. Os implantes foram lavados e desinfetados com amônia quaternária, posteriormente foram secos e guardados protegidos da luz. Este implante permaneceu no animal por 10 dias. Após 10 dias do início do protocolo de indução, o implante foi retirado e administrado 0,5 mg de cipionato de estradiol. (E.C.P. <sup>®</sup>, Zoetis, Brasil).

No D-55, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, quanto ao momento de receber o protocolo de indução da puberdade (Figura 1): grupo Indução45 (n = 45) - receberam o protocolo de indução da puberdade no D-55, com fim do protocolo de indução no D-45 e o início do protocolo de IATF no Dia 0; grupo Indução12 (n = 52) - receberam o protocolo de indução da puberdade no D-22, com fim do protocolo de indução no D-12 e o início do protocolo de IATF no Dia 0; grupo Controle (n = 55) - não receberam o protocolo de indução de puberdade, somente o protocolo de IATF com início do Dia 0. Os animais de todos os grupos foram mantidos no mesmo lote de manejo e começaram o protocolo de IATF no mesmo momento (Dia 0).

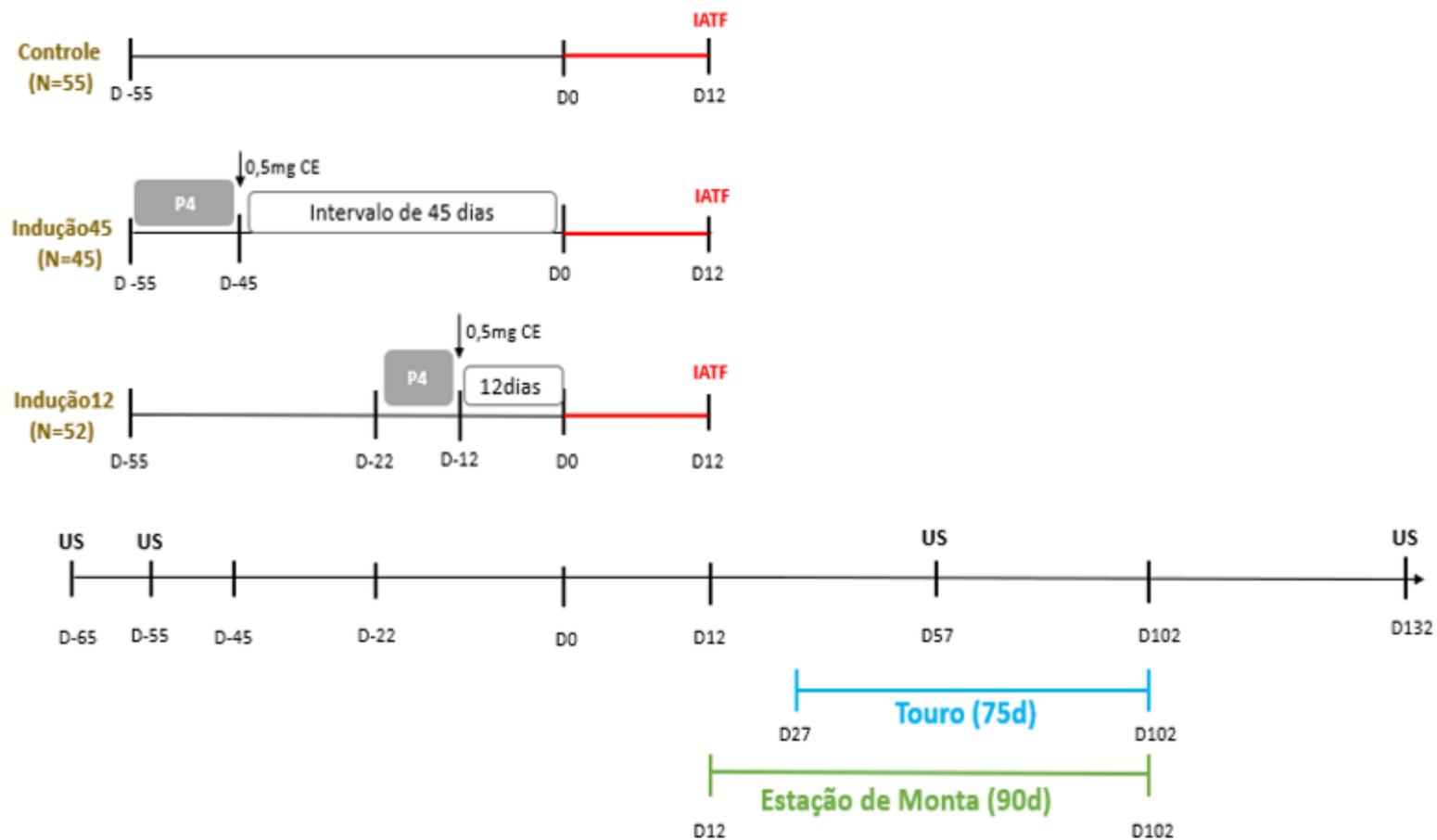
Para definir os intervalos entre os protocolos de indução de ciclicidade e a IATF utilizamos como base trabalhos semelhantes realizados anteriormente em novilhas pré-púberes da raça Nelore (RODRIGUES *et al.* 2014; REIS *et al.* 2012).

#### **4.5 Protocolo de sincronização da ovulação para IATF**

No início do protocolo de sincronização da ovulação (Dia 0), às 16h:00min, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P4) (Primer®, Agener União, Brasil) de primeiro uso e 2,0 mg IM de benzoato de estradiol (BE) (RIC-BE®, Agener União, Brasil). No Dia 9, às 16h:00min, os implantes intravaginais foram removidos e se administrou 25 mg IM de dinoprost (PGF2 $\alpha$ ) (Estron®, Agener União, Brasil) e 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis, Brasil).

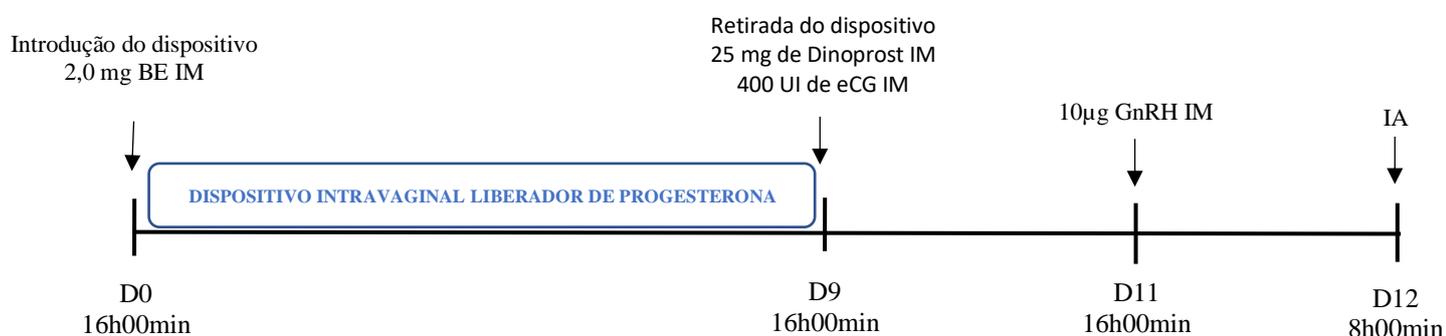
No Dia 11, às 16h:00min, as novilhas receberam 10  $\mu$ g IM de GnRH (Gestran®, Zoetis, Brasil). Os animais foram inseminados 16 horas após a aplicação de GnRH, a partir das 08h:00min.

Figura 1 - Protocolo para indução de puberdade em novilhas búfalas com 45 e 12 dias de intervalo até o início do protocolo de IATF, grupo controle, avaliações ultrassonográficas e seus respectivos dias e período de entrada e saída do touro e duração da estação de monta.



Fonte: A autora

Figura 2 - Protocolo de sincronização da ovulação para a IATF.



Fonte: A autora

#### 4.6 Repasse com touro

Após 15 dias da inseminação artificial, os animais foram mantidos por 75 dias com touro (D27-D102), foram utilizados 11 touros da raça Murrah, jovens, na proporção de 1/25, todos criados à pasto (Figura 1). Todos os touros foram previamente avaliados nos aspectos relacionados à capacidade reprodutiva por meio do exame andrológico completo, composto por exame clínico geral e exame específico dos órgãos reprodutivos, avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, mensuração do perímetro escrotal e avaliação do comportamento sexual, para garantir que estavam aptos à reprodução.

#### 4.7 Diagnóstico de gestação

No D57 (45 dias após a inseminação), o diagnóstico de gestação foi realizado por meio de ultrassonografia de acordo com a presença de vesícula embrionária. A taxa de prenhez foi calculada com base na proporção de novilhas prenhes no diagnóstico de gestação com relação ao número de fêmeas inseminadas (prenhez por inseminação; P/IA). No D132 (120 dias após a inseminação e 30 dias após a retirada do touro) outro diagnóstico de gestação foi realizado para avaliar a taxa de prenhez por touro.

#### 4.8 Análise estatística

No presente estudo, o delineamento preconizado foi o “Casualizado em Blocos”. Antes da distribuição entre os tratamentos, os animais foram distribuídos em três diferentes grupos de peso (Blocos): Leve (n = 50), com peso médio de 284,2±8,0 Kg; Intermediário (n = 59), com peso médio de 312,2±9,3 Kg; e Pesado (n = 43) com peso médio de 359,4±20,6 Kg. Após a formação dos blocos de peso, os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os tratamentos (Indução45, Indução12 e Controle), dentro de cada um dos 3 blocos de peso formados (Leve, Intermediário e Pesado).

As variáveis-resposta contínuas foram apresentadas como média aritmética, acompanhada do erro padrão da média, como medida de dispersão (média±EPM). As variáveis-resposta binomiais foram apresentadas como porcentagem (%; n/n), para frequência de ocorrência (prenhe = 1; vazia = 0). A comparação entre as respostas, de acordo com as variáveis classificatórias (Tratamento, Bloco e Tratamento\*Bloco), foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), usando o procedimento GLIMMIX do SAS® versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Dessa forma, o modelo estatístico foi composto pelas variáveis-resposta contínuas ou binomiais, variáveis classificatórias Tratamento, Peso e interação Tratamento\*Peso, assim como a covariável ECC no D-55 (efeito linear). Diferença significativa foi considerada quando  $P \leq 0,05$  e tendência quando  $P > 0,05$  e  $P \leq 0,10$ .

Os gráficos e as tabelas confeccionadas usando o programa Microsoft Excel versão 365 para Windows 10.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do experimento, de acordo com os diferentes grupos de indução, estão apresentados na Tabela 1. Com base no modelo estatístico, somente foi observado efeito de Tratamento ( $P = 0,0490$ ) para P/IA à IATF, no entanto, sem efeito para Peso ( $P = 0,1733$ ) ou para interação Tratamento\*Peso ( $P = 0,3005$ ). Também não foi observado efeito linear para ECC no D-55 ( $P = 0,4860$ ).

	Controle		Indução12		Indução45		P
	média	EPM	média	EPM	média	EPM	
Número de animais	55		52		45		.
Prenhez 45 dias após a IATF (15 d EM), %	21.8	(12/55) b	44.2	(23/52) a	42.2	(19/45) ab	0.0490
Perda gestacional (entre 45 e 120 dias após a IATF), %	25.0	(3/12)	13.0	(3/23)	36.8	(7/19)	0.9995
Prenhez do touro (75 d EM), %	51.2	(22/43)	33.3	(10/30)	38.5	(10/26)	0.1603
Prenhez da IATF + touro após 90 dias de EM, %	56.4	(31/55)	57.7	(30/52)	48.9	(22/44)	0.7881
Prenhez aos 45 dias de EM, %	36.4	(20/55)	46.2	(24/52)	43.2	(19/44)	0.6172
Momento médio da concepção na EM, dias	43.0	5.9	22.3	6.1	33.0	8.1	0.0638

Tabela 1 - Resultados da P/IA, prenhez por touro, prenhez total de IATF + touro, prenhez aos 45 dias da estação de monta, momento médio da concepção e perda gestacional.

Em relação à P/IA, o protocolo Indução12 foi maior que o grupo Controle, que não recebeu indução alguma. Esta informação vai ao encontro do que já estava disponível para bovinos, através de um estudo realizado em 2014 por Rodrigues *et al.* Os autores comprovaram que o intervalo de 12 dias entre o protocolo de indução e a inseminação artificial em tempo fixo aumenta as taxas de prenhez em novilhas Nelore pré-púberes, em relação a intervalos de 10 ou 14 dias entre o fim do protocolo de indução e o início do protocolo de IATF. Diante destes fatos, sugere-se que o protocolo mais curto, de 12 dias, é uma opção viável para aumentar a prenhez de novilhas búfalas pré-púberes submetidas à IATF.

Acreditamos que o grupo Indução45, que não diferiu estatisticamente do grupo controle, sofreu limitações de acordo com o número de animais utilizados por grupo no experimento.

Infelizmente, há grande dificuldade de realizar experimentos com fêmeas dessa categoria em bubalinos, o que provavelmente comprometeu a detecção de diferença entre o grupo Indução45 e o Controle.

Mesmo havendo muitos relatos da influência positiva do peso vivo sobre a prenhez, neste trabalho o peso não influenciou na taxa de prenhez. Uma explicação possível para isto é o fato de ter sido selecionado um peso mínimo de 270 Kg para a utilização dos animais, assim como descrito por Vaz *et al.* (2012) que, ao trabalharem com novilhas Charolês x Nelore aos 14 meses, observaram superioridade significativa ( $P < 0,05$ ) na demonstração de estro somente para novilhas que apresentavam, ao início do período reprodutivo, peso corporal  $\geq 316$  Kg.

Segundo Barcellos *et al.* (2006), o peso no início do acasalamento é a variável de maior impacto sobre a eficiência reprodutiva durante o primeiro acasalamento de novilhas de corte. Em novilhas Nelore com idade semelhante à dos animais utilizados neste estudo (12 a 15 meses), foram observadas taxas de indução de puberdade de 80%, porém, estes animais receberam suplementação após o desmame para atingir peso corporal de 300 Kg ao início do tratamento de indução de puberdade (DAY; NOGUEIRA, 2013).

Apesar da taxa de ciclicidade não ter sido mensurada neste estudo, existe grande possibilidade de o protocolo ter aumentado a taxa de ciclicidade dos animais. Este mesmo protocolo de indução de puberdade já havia demonstrado eficiência em outros estudos para induzir a atividade ovariana de novilhas bovinas pré-púberes, e assim ocasionar aumento na taxa de prenhez. Um estudo de Cabral *et al.* (2013) demonstrou que a utilização de protocolos hormonais com implante de progesterona de quarto uso foi capaz de induzir a atividade ovariana cíclica em novilhas. Outro estudo de AZEREDO *et al.* (2007) também demonstrou sucesso na utilização de progesterona em novilhas pré-púberes para iniciar a atividade estral.

Luiz (2018), em um estudo utilizando novilhas púberes e pré-púberes, obteve uma taxa de ciclicidade de 65% em 270 novilhas pré-púberes, com taxa de prenhez de 59,6% nas pré-púberes e 50,3% no grupo das púberes. Em outro estudo, ANDERSON *et al.* (1996) também obtiveram resultado satisfatório utilizando um protocolo somente à base de progestágeno (Norgestomet) durante 10 dias, induzindo a puberdade em 86% das novilhas utilizadas.

Em um trabalho com novilhas Nelore de um ano de idade, que não foram submetidas à nenhum tipo de indução de puberdade, nem à protocolo de IATF, a média de fertilidade

observada ao final de duas estações de monta foi de 12%. Este valor mostra que novilhas superprecoces que não são induzidas nem recebem IATF obtém baixas taxas de prenhez, caso todas as condições genética, nutricionais e de manejo não sejam adequadamente atendidas (MACHADO *et al.*, 2001).

Sendo assim, os protocolos de indução de puberdade se mostraram eficientes em novilhas búfalas pré-púberes e podem contribuir com a eficiência reprodutiva do rebanho. Além disso, o fato de um determinado animal responder à um tratamento de indução de puberdade pode significar também uma forma de seleção para precocidade sexual, tendo em vista que esta capacidade de resposta está relacionada à idade em que o animal apresentaria a primeira ovulação espontaneamente, o que pode representar em um grupo de novilhas submetidas ao mesmo manejo uma diferenciação (DAY; NOGUEIRA, 2013).

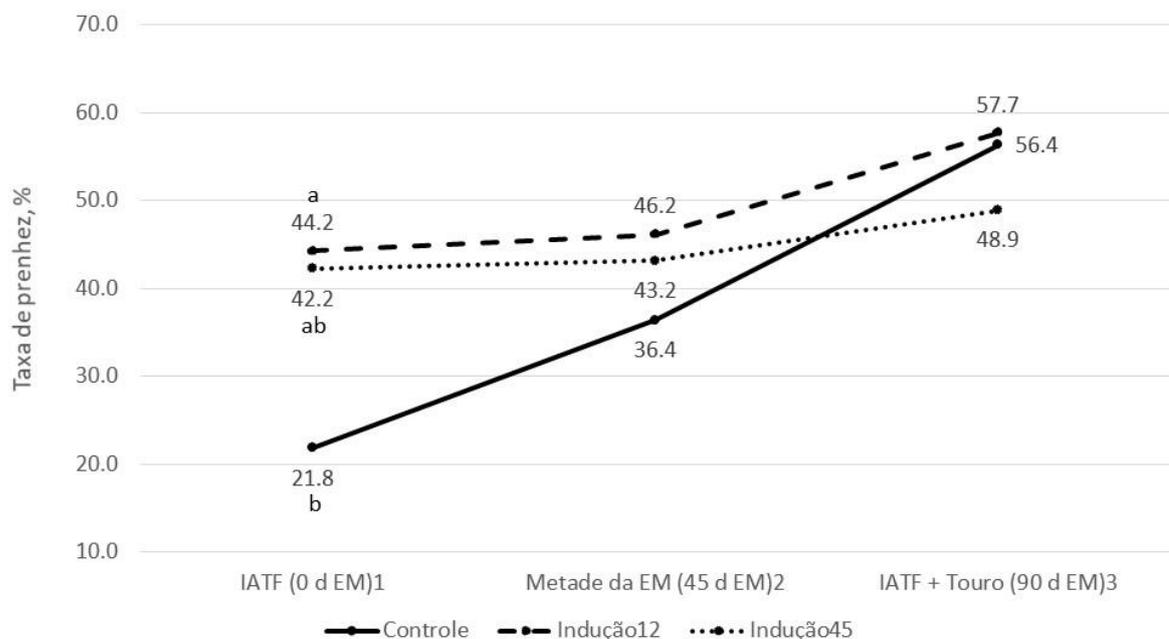
Como é possível observar na Tabela 1 e na Figura 3, os animais do grupo Controle, ou seja, os animais que não receberam protocolos de indução de puberdade, conseguiram emprenhar no repasse com touro, evidenciando assim que o uso de protocolos de IATF à base de P4+E2 pode também contribuir no alcance da puberdade de novilhas pré-púberes, sem necessariamente um prévio protocolo de indução. Após os protocolos de IATF realizado nos três grupos experimentais, a prenhez acumulada do grupo Controle cresce e se iguala aos demais grupos, ao final da estação de monta. Portanto, fica evidente que a IATF não só antecipa à ciclicidade das novilhas, como também é capaz de melhorar a produtividade dos rebanhos de cria através do aumento no número de bezerros desmamados durante a vida produtiva da fêmea (BARUSELLI *et al.*, 2004; BORGES, 2007; GOTTSCHALL *et al.*, 2009; GOTTSCHALL *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, foi possível observar que as novilhas que receberam o protocolo de indução de puberdade (Indução45 e Indução12) tiveram uma tendência ( $P = 0,06$ ) a emprenhar mais cedo que as novilhas do grupo Controle (Figura 3). Quando as novilhas emprenham mais cedo dentro da estação reprodutiva, têm maior probabilidade de conceberem na estação seguinte, quando primíparas (GREGORY; ROCHA, 2004; AZEREDO *et al.*, 2007; GOTTSCHALL *et al.*, 2008; GOTTSCHALL *et al.*, 2009). Ainda, Azeredo *et al.* (2007) observaram diferença significativa na concentração das partições ocorridas nos primeiros 20 e até os 40 dias da temporada reprodutiva nas novilhas submetidas à sincronização de estros quando do primeiro serviço.

Outra informação relevante foram as perdas gestacionais observadas em nossa pesquisa (13,0-36,8%), entre 45 e 120 dias após a inseminação. Mundialmente, as perdas reprodutivas são consideradas responsáveis pela maior causa de queda econômica isolada para os produtores. Tribulo *et al.*, (2017) relatou perdas embrionárias de até 35,5% em vacas de corte, do dia 32 ao dia 60 da gestação. Alguns fatores podem ser atribuídos à existência de perda gestacional, como a possibilidade da existência de agentes infectocontagiosos, ou de fatores ambientais e endócrinos que afetem a gestação. Em outro estudo, vacas que não expressaram estro apresentaram maior taxa de perdas gestacionais entre 30 e 60 dias de gestação, tendo, portanto, menor taxa de prenhez aos 60 dias de gestação e menor índice de parto (CEDEÑO *et al.*, 2018).

Um estudo envolvendo 145 búfalas inseminadas artificialmente obteve uma mortalidade embrionária de 6,9% dos animais, que ocorreu durante o dia 30-50 após a IA (BARUSELLI *et al.*, 1997). Outro estudo também com búfalas (n = 243) teve uma mortalidade embrionária entre os dias 26 e 40 em 45% dos animais e foi associada à presença de agentes infecciosos. (CAMPANILE, *et al.* 2005).

Figura 3 - Progressão da taxa de prenhez durante a estação de monta.



<sup>1</sup>IATF (0 d EM) - P = 0.0490;

<sup>2</sup>Metade da EM (45 d EM) - P = 0.6172;

<sup>3</sup>IATF + Touro (90 d EM) - P = 0.7881.

Alguns estudos atribuem aos agentes infecciosos, fatores ambientais e fatores iatrogênicos as perdas embrionárias e fetais (VANROOSE *et al.*, 2000). Segundo Romano (2004), a perda gestacional nos primeiros quatro meses de gestação foi de 19,2 % (106/551). Sendo observado que a perda de gestação entre 30 a 45, 46 a 60, 61 a 75 e 76 a 120 dias eram de 10,9%, 4,3%, 2,3% e 3,1%, respectivamente.

Lamb *et al.* (2003) relataram perdas reprodutivas de 11,7% em novilhas de corte entre o primeiro diagnóstico de gestação por ultrassonografia aos 30-35 dias após a IA e o segundo diagnóstico por palpação retal 120-125 dias após a IA, semelhante ao realizado neste experimento. Enquanto Holm *et al.* (2008) detectaram perdas reprodutivas em novilhas, do diagnóstico de gestação até o parto, de 12,6% e 12,3% para dois grupos de animais submetidos à inseminação artificial com observação de estro ou indução com prostaglandina, respectivamente.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização do protocolo de indução da puberdade à base de P4/E2 aumenta a P/IA de novilhas búfalas pré-púberes submetidas a programas de IATF, confirmando a hipótese de que o protocolo de indução aumenta a prenhez. O protocolo indução<sup>12</sup> foi mais eficiente que o grupo Indução<sup>45</sup> e o controle, rejeitando a hipótese de que o grupo indução<sup>45</sup> seria mais eficiente.

O protocolo de IATF à base de P4/E2 é capaz de igualar as taxas de prenhez do repasse com o touro e ao final da estação de monta, assim como a perda gestacional dos animais prenhez por inseminação, submetidos ou não à indução.

No entanto, usar protocolos de indução de puberdade à base de P4/E2 antes de programas de IATF tende a antecipar o momento da concepção dentro da estação de monta e, conseqüentemente, os partos da estação de parição subsequente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, E.B. Improving the reproductive performance of Egyptian buffalo cows by changing the management system. **Anim. Reprod. Sci.** 75, 1–8, 2003.

ABDEL-RAOUF M., The postnatal development of the reproductive organs in bulls with special reference to puberty. **Acta Endocrinologica**, v. 34, n. 2 Suppl, p. 9-109, 1960.

ALMEIDA, Marcos Rosa et al. Taxas de concepção e prenhez de novilhas submetidas a diferentes métodos de inseminação artificial. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 8, 2010.

ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progesterin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1025-1031, 1996.

Andurkar, S.B., Kadu, M.S., Chinchkar, S.R. and Sadekar, R.D. Serum progesterone profile in buffaloes treated with CIDR-Device and combinations. **Indian J. Anim. Reprod.** 18(2):104-107, 1997.

ARMSTRONG J D, BENOIT AM. Paracrine, autocrine, and endocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: an in vivo, IGF-I perspective. **J Anim Sci**, v.74, p.18-35, 1996.

AZEREDO, Diego Moreira de et al. Efeito da sincronização e da indução de estros em novilhas sobre a prenhez e o índice de repetição de crias na segunda estação reprodutiva. **Ciência Rural**, v. 37, p. 201-205, 2007.

BARASH, H.; SILANIKOVE, N.; WELLER, J. I. Effect of season of birth on milk, fat, and protein production of Israeli Holsteins. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 6, p. 1016-1020, 1996.

BARCELLOS, Julio Otavio Jardim et al. Taxas de prenhez em novilhas de corte acasaladas aos 18 e 24 meses de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1168-1174, 2006.

BARILE, V. L. et al. Effect of PRID treatment on conception rate in Mediterranean buffalo heifers. **Livestock Production Science**, v. 68, n. 2-3, p. 283-287, 2001.

BARMAN, Purabi et al. Effect of bull exposure on ovarian cyclicity in postpartum buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 30, p. 18-23, 2011.

BARUSELLI, P. S. et al. Early pregnancy ultrasonographic diagnosis and embryonic mortality occurrence in buffalo. In: **Proceedings 5th World Buffalo Congress, Royal Palace, Caserta, Italy, 13-16 October, 1997**. 1997. p. 776-778.

BARUSELLI, P. S. et al. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 360–362, 1999.

BARUSELLI, P. S. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 70–75, 2001.

BARUSELLI, P. et al. Use of progesterone associated to “Ovsynch” protocol for timed artificial insemination in buffalo. **Congresso Nazionale Sull’Allevamento Del Buffalo**. Anais. Roma: 2003.

BARUSELLI, P. S. et al. 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, Pietro S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 31,n.2, p. 205-211. 2007.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; JACOMINI, J. O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Supl.**, v. 6, p. 104–110, 2009.

BERGFELD, E. G. M. et al. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 5, p. 1051-1057, 1994.

BISINOTTO, R. S. et al. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol.

**Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2214–2225, abr. 2013.

BORGHESE, A. et al. Onset of puberty in Italian buffalo heifers. Note II – Influence of bull exposure on age at puberty. **International Symposium “Prospect of Buffalo Production in the Mediterranean and in the Middle East”**. Anais. Cairo, Egypt: 1993

BORGHESE, A. et al. Pubertà e mantenimento dell’attività ciclica ovarica nella bufala. **AGRICOLTURA RICERCA**, v. 153, n. January, 1994.

BORGHESE, A. et al. Onset of puberty in buffalo heifers in different feeding and management systems. **International Symposium on Buffalo Resources and Production Systems**. Anais. Cairo, Egypt: 1996

BORGHESE, A. et al. Feeding system effect on reproduction performances in buffalo heifers. **V World Buffalo Congress**. Anais. Caserta, Italy: 1997

BORGHESE, A.; TERZANO, G. M.; MAZZI, M. BUFFALO BREEDING DEVELOPMENT IN ITALY (Perkembangan Program Pemuliaan Kerbau di Italia). **Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau**, p. 23–30, 2011.

BRAGANÇA, J.F.M.; GONÇALVES, P.B.D.; BASTOS, G.M.; NEVES J.P.; OLIVEIRA J.F.C.; SIQUEIRA L.C.; BORGES L.F.K.; POMBO R.D. Sincronização de estro e ovulação em novilhas de 12 a 14 meses de idade e inseminadas artificialmente com observação de estro e horário pré-fixado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.28, n.2, p.73-77, 2004.

BRONSON, F. H. Puberty in female rats: relative effect of exercise and food restriction. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 252, n. 1, p. R140-R144, 1987.

BROOKS, Ann Louise; MORROW, R. E.; YOUNGQUIST, R. S. Body composition of beef heifers at puberty. **Theriogenology**, v. 24, n. 2, p. 235-250, 1985.

BUSKIRK, D. D.; FAULKNER, D. B.; IRELAND, F. A. Increased postweaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 937-946, 1995.

BYERLEY DJ, STAIGMILLER RB, BERARDINELI JG, SHORT RE. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal of Animal Science**. 1987; 65:645- 50.

CABRAL, Jakeline Fernandes et al. Indução do estro em novilhas Nelore com implante intravaginal de progesterona de quarto uso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, 2013.

CADIMA, Gustavo Pereira et al. Efeito da indução de puberdade em novilhas nelore no desempenho reprodutivo na estação de monta. 2018.

CAMPANILE, G. et al. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 1–11, 2010.

CAMPANILE, Giuseppe et al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2334-2340, 2005.

CARVALHO, N. A. T. et al. Ovulation and conception rates according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the off breeding season. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 646–648, 2007.

CARVALHO, N. A. T. et al. Ovulation synchronization with estradiol benzoate or GnRH in a timed artificial insemination protocol in buffalo cows and heifers during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 87, p. 333-338, 2017.

CEDEÑO A, TRÍBULO P, TRÍBULO A, BARAJAS JL, ORTEGA JA, ANDRADA JS, CHENOWETH, P. J. Sexual behavior of the bull: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 1, p. 173-179, 1983.

CHILD, Tim J. et al. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 76, n. 5, p. 936-942, 2001.

CLARO JÚNIOR, I., PERES R. F. G., AONO F. H.; DAY M. L., VASCONCELOS J. L. M. 2010. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**. v. 74, 903-11.

COLLIER, R. J.; DAHL, G. E.; VANBAALE, M. J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1244-1253, 2006.

COOKE, R. F., BOHNERT D. W., FRANCISCO C. L., MARQUES R. S., MUELLER C. J., KEISLER D. H., Effect of bovine somatotropin administration on growth, physiological and reproductive responses of replacement beef heifers. **J. Anim. Sci.** 91, 2894-2901. 2013.

DARWEISH, S. A. et al. Optimizing the Age of Puberty in Buffalo Heifers by Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) and/or Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). **Journal of American Science**, v. 12, n. 9, 2016.

DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 31, n. 2, p. 332-341, 1984.

DAY, M. L. et al. 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. 1054-1065, 1987.

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

DAY, Michael L.; NOGUEIRA, Guilherme P. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 6-11, 2013.

DE CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; BARUSELLI, P. S. Strategies to overcome seasonal anestrus in water buffalo. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 200–206, 2016.

DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 447–449, 2007.

ELER, Joaquir Pereira; JÚNIOR, Mário Luiz Santana; FERRAZ, José Bento Sterman. Seleção

para precocidade sexual e produtividade da fêmea em bovinos de corte. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 37, n. 5, p. 699-711, 2010.

ENDECOTT, R. L.; FUNSTON, R. N.; MULLINIKS, J. T.; ROBERTS, A. J. Implications of beef heifer development systems and lifetime productivity. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1329–1335, 2013.

EVANS, A. C. O.; CURRIE, W. D.; RAWLINGS, N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Reproduction**, v. 96, n. 2, p. 847-855, 1992.

FERREIRA, F. R. A.; NETO, C. C. C.; FILHO, M. R. T.; FERRI, S. T. S.; MONTALDO, Y. C. Efeito do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista Verde**, v.5, n.5, p. 01-25, 2010.

FERRELL, C. L. Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 6, p. 1272-1283, 1982.

FLECK, A. T.; SCHALLES, R. R.; KIRACOFÉ, G. H. Effect of growth rate through 30 months on reproductive performance of beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. 4, p. 816-821, 1980.

FONSECA JF DA, CRUZ R DO C, OLIVEIRA MEF, SOUZA-FABJAN JMG DE, VIANA JHM. Biotecnologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos. **Embrapa**, editor. Brasília. 2014.

FREITAS, Bruno Gonzalez de. **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. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FREITAS, B. G. et al. Relationship of body maturation with response to estrus synchronization and fixed-time AI in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Livestock Science**, p. 104632, 2021.

FUJITA, Aline Silva et al. Taxa de gestação em novilhas nelore sincronizadas para IATF e inseminadas com sêmen resfriado e congelado. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.

GHUMAN, S. S, HONPARKHE., M, DADARWAL, D., SINGH, J., DHALIWAL, G. S., JAIN, A. K. Melatonin implant treatment for initiation of ovarian cyclicity in anestrus buffaloes. In: **Proceedings of XXIII ISSAR conference held at Orissa University of Agriculture and Technology**, Bhubaneswar, p. 36. 2007.

GHUMAN, S.P., JONES, D.N., PRABHAKAR, S., SMITH, R.F., DOBSON, H., 2008. GABA control of GnRH release from the ewe hypothalamus in vitro: sensitivity to oestradiol. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00948.x>.

GHUMAN, S. P. S. et al. Induction of ovulation of ovulatory size non-ovulatory follicles and initiation of ovarian cyclicity in summer anoestrous buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) Using melatonin implants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 600–607, 2010.

GIMENES, L. U. et al. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3–4, p. 175–179, 2011.

GOKULDAS, P. P. et al. Resumption of ovarian cyclicity and fertility response in bull-exposed postpartum buffaloes. **Animal reproduction science**, v. 121, n. 3-4, p. 236-241, 2010.

GONG JG, BAXTER G, BRAMLEY TA, WEBB R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J Reprod Fertil**, v.110, p.91-97, 1997.

GOTTSCHALL, Carlos Santos; DA SILVA, Leonardo Rocha. Resposta reprodutiva de novilhas de corte aos dois e três anos de idade submetidas a diferentes protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). **Revista Veterinária em Foco**, v. 10, n. 1, 2012.

GRANGER, A. L., WYATT W. E., CRAIG W. M., THOMPSON D. L., HEMBIY F. G., 1989. Effects of breed and wintering diet on growth puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in heifers. **Dom. Anim. Endocrinol.** 6, 253-263.

GREGORY, R. M.; ROCHA, D. C. Protocolos de sincronização e indução de estros em vacas de corte no Rio Grande do Sul. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada – Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2004, Londrina. Anais... Londrina: [s.n.], 2004. p.

147-154.

GRILLO, Gustavo Fernandes et al. Comparação da taxa de prenhez entre novilhas, primíparas e múltiparas da raça Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 3, p. 193-197, 2015.

GUIMARÃES, M. M. Parâmetros biométricos e reprodutivos como indicadores de fertilidade em novilhas búfalas pré-púberes submetidas à iatf. Orientador: Bruno Moura Monteiro. 2020. Dissertação de mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Campus Castanhal, 2020.

HALDAR, A.; PRAKASH, B. S. Peripheral patterns of growth hormone, luteinizing hormone, and progesterone before, at, and after puberty in buffalo heifer. **Endocrine research**, v. 31, n. 4, p. 295-306, 2005.

HALDAR, A., PRAKASH B. S. Growth hormone-releasing factor (GRF) induced growth hormone advances puberty in female buffaloes. **Anim. Reprod. Sci.**, 92, 254-267. 2006.

HALL, J. B., SCHILLO K. K., FITZGERALD B. P., BRADLEY N. W. Effect of recombinant bovine somatotropin and diet energy intake on growth, secretion of luteinizing hormone, follicular development and onset of puberty in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, 72, 709-718. 1994.

HALL, J. B. et al. 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. 1606-1611, 1997.

HERRINGTON J, CARTER-SU C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends Endocrinol Metab**, v.12, p.252-257, 2001.

HOLM, D. E.; THOMPSON, P. N.; IRONS, P. C. The economic effects of an estrus synchronization protocol using prostaglandin in beef heifers. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1507-1515, 2008.

HONNAPPAGOL, S. S.; PATIL, R. V. Oestrus synchronization and fertility in buffalo heifers using Carboprost Tromethanine. **Indian J. Anim. Reprod.**, v. 12, n. 2, p. 177-179, 1991.

HUTCHINSON LA, FINDLAY JK, HERINGTON AC. Growth hormone and insulin-like

growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, v.55, p.61-69, 1988.

ITOH M. T., ISHIZUKA B., KURIBAYASHI Y., AMEMIYA A. & SUMI Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. ***Molecular Human Reproduction***. 5 (5):402–408. 1999.

JAEGER, J., STORMSHAK, F., DEL CURTO, T., FITTE, K. Melatonin to induce puberty in virgin heifers. ***Eastern Oregon Agricultural Center***, Annual report, USA. 1998.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Cattle and Buffalo. In: ***Reproduction in Farm Animals***. Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2016. p. 157–171.

KINDER, James Edward; DAY, M. L.; KITOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. ***J Reprod Fertil Suppl***, v. 34, p. 167-186, 1987.

SWEETS, J. E. et al. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. ***Journal of Reproduction and Fertility-Supplements only***, n. 49, p. 393-408, 1995.

KINDER JE, KOJIMA FN, BERGFELD EG, WEHRMAN ME, FIKE KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. ***Journal of Animal Science***. 1996; 74: 1424-4-.

LAMB, G. C.; DAHLEN, C. R.; BROWN, D. R. Reproductive ultrasonography for monitoring ovarian structure development, fetal development, embryo survival, and twins in beef cows. ***The Professional Animal Scientist***, v. 19, n. 2, p. 135-143, 2003.

LAMMERS, B. P.; HEINRICHS, A. J.; KENSINGER, R. S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. ***Journal of Dairy Science***, v. 82, n. 8, p. 1753-1764, 1999.

LEE C., DO B.R., LEE Y., PARK J., KIM S., KIM J., ROH S., YOON Y. & YOON H. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. ***Molecular Reproduction and Development***. 59 (2): 126–132. 2001.

LESMEISTER, J. L.; BURFENING, PI 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.

LOZANO D, MONGUILLOT I, BRANDAN A, TRIBULO R, TRIBULO H, BÓ GA. 2018. Effect of synchronization treatment and estrus expression on conception rates and pregnancy losses in recipients receiving in vitro produced embryos. **Reprod Fertil Dev**, 30:181.

LUCY, M. C. et al. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF $2\alpha$  for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 4, p. 982-995, 2001.

LUIZ, Débora Schneid Vaz. **Indução da ciclicidade e taxa de prenhez em novilhas taurinas de corte tratadas com progesterona injetável e cipionato de estradiol**. 2018.

MACEDO, B. S.; LIMA, M. E; RAMOS, L. R.; RABASSA, V.R; PINO, F.A.B.D; BIANCHI, I; CORRÊA, M.N. Aplicabilidade da somatotropina recombinante (rbST) na pecuária de leite. Pelotas: UFPEL, 4p. (Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária), 2009.

MACHADO, P. F. A. et al. Predição da taxa de gestação de novilhas da raça Nelore acasaladas com um ano de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1-10, 2001.

MANN G, LAMMING G. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**. 1999;34:269-74.

MARSON, E. P.; GUIMARAES, J. D.; MIRANDA NETO, T. Puberty and sexual maturity in beef heifers. **Revista Brasileira de Reproducao Animal (Brazil)**, 2004.

MARTIN, G.B. Social-sexual signs and reproduction in mammals – an overview. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE FEROMONAS Y BIOESTIMULACIÓN SEXUAL, 1., 2002. Anais... Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 2002. p.11-28.

MIGUEZ, Patrícia Helena Paiva. **Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL (Poli-É-caprolactona)+ PHB (Poli-hidroxibutirato)**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MONTEIRO, B. M. et al. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used progesterone devices, during the breeding season (autumn-winter). **Animal Science Journal**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 2016.

MONTEIRO, B.M. et. al. Effect of season on dairy buffalo reproductive performance when using P4/E2/eCG-based fixed-time artificial insemination management. **Theriogenology**, v. 119, p. 275-281, 2018.

NEIBERGS, H. L.; REEVES, J. J. Synchronization of estrus in yearling beef heifers with melengestrol acetate and prostaglandin F $2\alpha$ . **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 395-400, 1988.

NEPOMUCENO, Delci de Deus. **Efeito do manejo nutricional sobre a maturação do eixo reprodutivo somatotrófico no início da puberdade de novilhas Nelore**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NOGUEIRA GP. Puberty in South America in *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**. 2004;82-83:361, 2004.

NONATO, Marina Silveira et al. Programa de Iatf em novilhas puberes e prepubereres. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 24707-24712, 2019.

OJEDA SR. JAMESON HE. Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology*; 100:881-889. 1977.

OLIVEIRA, C. M. G.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L.; VIU, M. A. O.; LOPES, D. T.; SOUSA, A. P. F. Effects of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos indicus*) in a tropical environment. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.113, p.38-43, 2009.

PATTERSON, D. J.; CORAH, L. R.; BRETHOUR, J. R. Response of prepubertal *Bostaurus* and *Bosindicus* × *Bostaurus* heifers to melengestrol acetate with or without gonadotropin-releasing hormone. **Theriogenology**, v. 33, n. 3, p. 661-668, 1990.

PATTERSON, D. J. et al. Management considerations in heifer development and puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 4018-4035, 1992.

PAWSHE, C. H., RAW K. B., TOTEY S. M., 1998. Effect of insulin-like growth factor-1 and its interaction with gonadotropin on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. **Molecular Reprod. and Dev.**, 29, 277- 285.

PENCHEV, P. Phenotypic and genotypic evaluation of the buffalo population bred in Bulgaria. **Bulgarian Journal of Agricultural Science (Bulgaria)**, 1998.

PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 194-199, 2011.

PFEIFER, Luiz Francisco Machado et al. Avaliação biológica e econômica do uso de flunixin meglumine em vacas e novilhas de corte inseminadas em tempo fixo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1392-1397, 2008.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effect of the duration of progestagen exposure and sexual maturity on the pregnancy rate of beef heifers: economic and biological evaluation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1205-1210, 2009.

PHOGAT, J. B. et al. Seasonality in Buffaloes Reproduction. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 6, n. 2, p. 46–55, 2016.

PLANSKI, V. et al. Influence of melatonin treatment on puberty onset in buffalo heifers from bulgarian murrh breed. **Applicability of assisted reproduction techniques in contemporary**, p. 56, 2017.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, nov. 1995.

QUADROS, Sergio Augusto Ferreira de; LOBATO, José Fernando Piva. Bioestimulação e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 679-683, 2004.

RAINALEY JA, PHARES CK Delay of puberty onset in females due to suppression of growth hormone. **Endocrinology** 1980; 106:1989-1993.

RAFIQ, M. et al. Effect of level of concentrate supplementation on growth rate and age at maturity in growing buffalo heifers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 37, 2008.

RAMADAN, T. A., SHARMA, R. K., PHULIA, S. K., BALHARA, A. K., GHUMAN, S. S., SINGH, I. Effectiveness of melatonin and controlled internal drug release device treatment on reproductive performance of buffalo heifers during out-of-breeding season under tropical conditions. **Theriogenology**, 82: 1296–1302. 2014.

RASBY, R. J. et al. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 55-63, 1998.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C.R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; PICKERING, K. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of controlled release**, v.85, p. 105-115, 2002.

RAWLINGS, N. C. et al. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 259-270, 2003.

REIS, T. A. N. P. S; SÁ FILHO, Manoel Francisco de; MONTEIRO, B. M; *et al.* A indução de puberdade em novilhas Nelore aos 45 ou 90 dias antes da estação de monta aumenta as taxas de ciclicidade e de prenhez. **Anais..** Jaboticabal: [s.n.], 2012.

ROBERTS, A. J. et al. Reproductive performance of heifers offered ad libitum or restricted access to feed for a one hundred forty-day period after weaning. **Journal of animal science**, v. 87, n. 9, p. 3043-3052, 2009.

ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2006.

ROCHA, Marta Gomes da; LOBATO, José Fernando Piva. Evaluation of reproductive performance of primiparous beef heifers at two years old. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1388-1395, 2002.

RODRIGUES, A. D. P. et al. 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, Adnan Darin Pereira. Estratégias hormonais para aumentar a taxa de prenhez em novilhas nelore pré-púberes. 2012

ROMANO, Terrie M. The cattle plague of 1865 and the reception of “the germ theory” in mid-Victorian Britain. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 52, n. 1, p. 51-80, 1997.

ROMANO, J. E. Early pregnancy diagnosis and embryo/fetus mortality in cattle. dissertation, doctor of philosophy. 2004.

RÖNNBERG L., KAUPPILA A., LEPPÄLUOTO J., MARTIKAINEN H. & VAKKURI O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 71(2): 492–6. 1990.

SÁ FILHO, M. F. et al. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. **Animal reproduction science**, v. 160, p. 30-39, 2015.

SÁ FILHO, M. F. et al. Manejo reprodutivo estratégico e IATF em novilhas e vacas primíparas zebrúinas de corte. **Simpósio internacional de reprodução animal aplicada**, v. 5, 2012.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 182-187, 2010.

SAINI, M.S., GALHOTRA, M.M., SANGWAN, M.L., RAZDAN, M.M. Use of PRID in inducing estrus and its effect on the sexual behaviour of Murrah buffalo heifers. **Indian J. Dairy Sci.** 41 (1), 40–42, 1988.

SHARARA FI, NIEMAN LK. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. **J Clin Endocrinol Metab**, v.79, p.670-672, 1994.

SHEIKHOLISLAM BM, STEMPFE RS JR. Hereditary isolated somatotropin deficiency: effects of human growth hormone administration. **Pediatrics** 1972; 49:362-374. 1986.

SILVA, M.D.; BARCELLOS, J.O.J.; PRATES, E.R. Desempenho reprodutivo de novilhas de corte acasaladas aos 18 ou aos 24 meses de idade. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, p.2057-2063, 2005.

SILVEIRA, M. V. et al. Interação genótipo x ambiente sobre características produtivas e reprodutivas de fêmeas Nelore. **Archivos de zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 223-226, 2014.

SINGH, J., GHUMAN S. P. S., DADARWAL, D., HONPARKHE, M., DHALIWAL, G. S., JAIN, A. K. Estimations of blood plasma metabolites following melatonin implants treatment for initiation of ovarian cyclicity in true anestrus buffalo heifers. **Indian J. Anim. Sci.** 80 (3): 229–231. 2010.

SIROTKIN AV, MAKAREVICH AV. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. **Anim Reprod Sci**, v.70, p.111-126, 2002.

SOARES J. M. JR, MASANA M. I., ERSAHIN C. & DUBOCOVICH M. L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 306 (2): 694–702. 2003.

SOARES, Ana Flávia Cunha et al. Influência da bioestimulação sobre características ovarianas e taxa de prenhez em novilhas Nelore. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, 2008.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MORGAN, G. L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2001.

SRINIVASAN V., SPENCE W.D., PANDI -PERUMAL S. R., ZAKHARIA R., BHATNAGAR K. P. & BRZEZINSKI A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**. 25 (12): 779–785. 2009.

STEWART, F.; ALLEN, W. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of reproduction and fertility**, v. 62, p. 527–536, 1981.

SUTHAR, V. S.; DHAMI, A. J. Estrus detection methods in buffalo. **Veterinary World**, v. 3, n. 2, p. 94–96, 2010.

TAIRA, Edson Massao et al. Uso de LH como indutor de ovulação em protocolo de IATF para Novilhas da raça Nelore. In: **Colloquium Agrariae. ISSN: 1809-8215**. 2010. p. 43-49.

TAMURA H., NAKAMURA Y., KORKMAZ A., MANCHESTER L. C., TAN D. X., SUGINO N. & REITER R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. 92 (1): 328–343. 2009.

TANAKA, Y. et al. Variable progesterone response and estradiol secretion in prepubertal beef heifers following treatment with norgestomet implants. **Theriogenology**, v. 43, n. 6, p. 1077-1086, 1995.

TANEJA, V. K. Dairy breeds and selection. **Smallholder dairying in the tropics**, p. 71-99, 1999.

TERZANO, G. M. et al. Onset of puberty in buffalo heifers bred on pasture or in intensive feeding system. **Agric. Sci.**, v. 2, p. 89–92, 1996.

TERZANO, G. M. et al. Effect of intensive or extensive systems on buffalo heifers performances: onset of puberty and ovarian size. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup2, p. 1273–1276, jan. 2007.

TERZANO, G. M.; BARILE, V. L.; BORGHESE, A. Overview on Reproductive Endocrine Aspects in Buffalo. **Journal of Buffalo Science**, v. 1, p. 126–138, 2012.

THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.

TIBARY, A. et al. Reproductive patterns of Santa Gertrudis heifers in Morocco: II. Fertility of cyclic and acyclic heifers after synchronization of estrus. **Theriogenology**, v. 37, n. 2, p. 389-393, 1992.

TORTONESE D. J., INSKEEP E. K. Effects of melatonin treatment on the attainment of puberty in heifers. **J Anim Sci.**, 70:2822–2827. 1992.

TRALDI A DE S, LOUREIRO MFP, CAPEZZUTO A, MAZORRA AL. 2007. Control methods of goat reproduction. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horiz. 31:254–260.

TRIBULO A, Cedeño AJ, Bernal B, Andrada S, Barajas JL, Ortega J, Oviedo J, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bó GA. 2017. Factors affecting pregnancy rates and embryo/fetal losses in recipients receiving in-vitro-produced embryos by fixed-time embryo transfer. *Reprod Fertil Dev* 29:160

VAICIUNAS, Aline et al. Leptin and hypothalamic gene expression in early-and late-maturing Bos indicus Nelore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 657-664, 2008.

VALE, W. G. et al. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. Livestock reproduction in Latin America. Proceedings of the final research co-ordination meeting, Bogota, 19-23 September 1988. Organized by the joint FAO/IAEA. **Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.**, p. 201–210, 1990.

VALE, W. G. Reproductive management of water buffalo under amazon conditions. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 85–90, 1994.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos : puberdade , ciclo estral , involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. p. 63–73, 2005.

VALE, W. G.; WEITZE, K. F.; GRUNERT, E. Estrous behaviour and ovarian function in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) under Amazon conditions. **10th International Congress on Animal Reproduction and AI**. Anais.Urbana, Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign, 1984

VANROOSE, G. et al. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.131-143, 2000.

VAZ, R.Z.; RESTLE, J.; PACHECO, P.S.; VAZ, F.N.; PASCOAL, L.L.; VAZ, M.B. Ganho de peso pré e pós-desmame no desempenho reprodutivo de novilhas de corte aos quatorze meses de idade. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.13, n.3, p.272-281, 2012

VIANNA, G.N.O.; KOZICKI, L.E.; WEISS, R.R. et al. Comparison of different protocols for estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in Nelore cows under postpartum anestrus. **Archives of Veterinary Science**,v.13, n.4, p.247-254, 2008.

VOGG, G.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M.; MORAES J.C.F. Utilidade do benzoato de estradiol após suplementação com progestágeno na sincronização de cios de novilhas de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 41-46, 2004.

WILTBANK, J.N.; KASSON, C.W.; INGALLS, J.E. Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed. **Journal of Animal Science**, v.29, p. 602-605, 1969.

WETTEMANN, R. P.; BOSSIS, I. Energy Intake Regulates Ovarian Function in Beef Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. E-Suppl, p. 1–10, 2000.

WHITE, S. S.; KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V. R. Fertility after two doses of PGF $2\alpha$  concurrently or at 6-hour interval on the day of CIDR removal in 5-day CO-Synch progesterone-based synchronization protocols in beef heifers. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 785–790, Aug. 2016.

WHEATON, J.E.; LAHM, G.C. Induction of cyclicity in postpartum anestrous beef cows using progesterone, GnRH and estradiol cypionate. (ECP). **Animal Reproduction Science**, v.102, p.208-216, 2007.

YAKAR S, ROSEN CJ, BEAMER WG, ACKERT-BICKNELL CL, WU Y, LIU JL, OOI GT, SETSER J, FRYSTYK J, BOISCLAIR YR, LEROITH D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **J Clin Invest**, v.110, p.771-781, 2002.

YELICH, J. V., WETTEMANN R. P., DOLEZAL H. G., LUSBY K. S., BISHOP D. K., SPICER L. J. Effect of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like factor-1 and metabolites before puberty in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, 73, 2390-2405. 1995.

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

YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M. T.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIDYAPONG, S.; NA636 CHIANGMAI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VAN DER WEYDEN, G. C.; 637 COLENBRANDER, B. Follicular dynamics and oestrous detection in Thai postpartum 638

swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. e91-639 6, fev. 2011.

ZICARELLI, L., DE FILIPPO, C., FRANCILO, M., PACELLI, C., VILLA, E. Influence of insemination technique and ovulation time on fertility percentage in synchronized buffaloes. In: Proc. **V. World Buffalo Congress, Caserta**, Italy, 13–16 October 1997 pp. 732–737, 1997.

ZICARELLI, L. Management in different environmental conditions. **Buffalo Journal**, Suppl. 2:17-38, 1994.