



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ- UFOPA
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ISABELLA DE OLIVEIRA BÊTA

**DINÂMICA FOLICULAR E PERFIL HORMONAL EM NOVILHAS NELORE E
MURRAH PRÉ-PÚBERES SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM
TEMPO FIXO (IATF)**

SANTARÉM/PARÁ

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ- UFOPA
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
ISABELLA DE OLIVEIRA BÊTA

**DINÂMICA FOLICULAR E PERFIL HORMONAL EM NOVILHAS NELORE E
MURRAH PRÉ-PÚBERES SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM
TEMPO FIXO (IATF)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Kedson
Alessandri Lobo Neves

SANTARÉM/PARÁ

2024

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema
Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

B562d Bêta, Isabella de Oliveira
Dinâmica folicular e perfil hormonal em novilhas nelore e murray pré-púberes sub-
metidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). / Isabella de Oliveira
Bêta. - Santarém, 2024.
77 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Kedson Alessandri Lobo Neves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiver-
sidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.


1. Biotecnologia. 2. Hormônios. 3. Pré-púberes. 4. Puberdade. 5. Reprodução.
I. Ne- ves, Kedson Alessandri Lobo, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 636.21


Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

Conceito: Aprovado


Data de aprovação: 19 de dezembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **KEDSON ALESSANDRI LOBO NEVES**
Data: 28/12/2024 07:44:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. Kedson Alessandri Lobo Neves - Orientador.
Universidade Federal do Oeste do Pará.

Documento assinado digitalmente
 **ALINE PACHECO**
Data: 30/12/2024 11:45:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. - Aline Pacheco.
Universidade Federal do Oeste do Pará.

Documento assinado digitalmente
 **RONALDO FRANCISCO DE LIMA**
Data: 03/01/2025 14:44:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. - Ronaldo Francisco de Lima.
Universidade Federal do Oeste do Pará.

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA**
Data: 03/01/2025 13:43:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. - Josiane Elizabeth Almeida e Silva.
Centro Universitário da Amazônia.



Universidade Federal do Oeste do Pará
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº **0520230262**, intitulado **DINÂMICA FOLICULAR E PERFIL DE PROGESTERONA E ESTRÓGENO EM NOVILHAS NELORE E MURRAH PRÉ PUBERE SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)**., sob a responsabilidade de **Kedson Alessandri Lobo Neves**, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº **0520230262**, entitled "**DINÂMICA FOLICULAR E PERFIL DE PROGESTERONA E ESTRÓGENO EM NOVILHAS NELORE E MURRAH PRÉ PUBERE SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)**.", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 28/06/2023

Profª. Dra. Aline Pacheco
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/validar-certificado>

Aos meus pais por todo o apoio e carinho.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pela força, inspiração e proteção ao longo desta jornada acadêmica.

Aos meus pais Carlos Augusto F. Bêta e Maria José de Oliveira Bêta, aos meus irmãos, pelo amor incondicional, apoio constante e por acreditarem em mim em todos os momentos. Vocês são a base de tudo que conquistei.

Ao meu orientador, Professor Kedson Alessandri Lobo Neves, pela orientação, conhecimentos compartilhados e por todo o suporte necessário, estendo o agradecimento a todos os docentes que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos pessoais e de vida acadêmica, em especial a mestranda Larissa de Paiva Nunes Gonçalves por todo o suporte e incentivo.

A todos, meu sincero e profundo agradecimento.

RESUMO

O objetivo deste experimento foi induzir a puberdade, avaliar a dinâmica folicular e o perfil dos hormônios progesterona (P4) e estradiol (E2) em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes, empregando o uso da biotecnologia de inseminação artificial em tempo fixo. Foram utilizadas 6 novilhas Nelore pré-púberes (n = 6) com idade média de 14 a 17 meses, pesando 320 kg a 350 kg e 6 novilhas Murrah pré-púberes (n = 6) com idade média de 14 a 17 meses, com peso entre 422kg a 523 kg, devidamente identificadas. Para selecionar as novilhas pré-púberes, foi realizada uma ultrassonografia para confirmar a ausência de corpo lúteo (CL), garantindo a seleção dos animais que ainda não haviam iniciado a ciclicidade. O protocolo de IATF utilizado consistiu em um implante intravaginal com 0,5 mg de progesterona (P4). No início do protocolo (D0), todas as novilhas receberam o dispositivo intravaginal de P4, aplicação de benzoato de estradiol (BE) e prostaglandina F2 α . No (D7), o implante foi removido das novilhas Nelore, e estas receberam cipionato de estradiol, prostaglandina F2 α e gonadotrofina coriônica equina (eCG) por via intramuscular (IM). A inseminação das Nelore ocorreu no (D9), entre 48 e 56 horas após a remoção do implante de P4. Nas novilhas Murrah, o implante foi removido no D9, seguido da aplicação de prostaglandina F2 α e eCG via IM. No (D11), as bubalinas receberam hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), e a inseminação foi realizada no (D12), cerca de 16 horas após a aplicação de GnRH. Durante o protocolo de IATF, todas as novilhas foram submetidas à coleta de sangue para medir os níveis hormonais de progesterona e estradiol. Nas Nelore ocorreram nos dias D7 e D9, enquanto nas Murrah foram feitas nos dias D9 e D12, por punção da veia jugular. Paralelamente, foram realizados exames ultrassonográficos para monitorar a dinâmica folicular, acompanhando o desenvolvimento dos folículos e determinando o momento da ovulação, identificado pela ausência do folículo ovulatório. O estudo demonstrou que o diâmetro folicular ovulatório médio das novilhas foi de $7,83 \pm 2,25$ mm em Nelore e $7,7 \pm 1,63$ mm em Murrah, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as espécies. O diâmetro do folículo dominante na retirada do implante de P4 foi de $6,5 \pm 1,59$ mm em Nelore e $6,9 \pm 4,97$ mm em Murrah. Os níveis médios de progesterona foram de 0,76 ng/mL em Nelore e 1,42 ng/mL em Murrah na primeira coleta, e de 1,00 ng/mL e 0,52 ng/mL, respectivamente, na segunda. Os níveis de estrógeno, por sua vez, foram de 9,28 pg/mL em Nelore e 26,75 pg/mL em Murrah na primeira coleta, e de 11,20 pg/mL e 11,59 pg/mL na segunda. Embora o estudo não tenha demonstrado diferença significativa no diâmetro folicular entre as duas raças, observou-se uma diferença nas respostas reprodutivas. As novilhas Nelore apresentaram uma taxa de ovulação de 100%,

enquanto as Murrah tiveram apenas 50%. Além disso, as Murrah apresentaram níveis mais altos de estrógeno na primeira coleta. Esses achados reforçam a importância de ajustar os protocolos de indução de puberdade e IATF conforme as particularidades de cada raça, no intuito de otimizar os resultados reprodutivos.

Palavras-chave: biotecnologia; hormônios; pré-púberes; puberdade; reprodução.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to induce puberty, evaluate follicular dynamics and the profile of the hormones progesterone (P4) and estradiol (E2) in pre-pubertal Nelore and Murrah heifers, employing the use of fixed-time artificial insemination biotechnology. We used 6 pre-pubertal Nelore heifers (n = 6) with an average age of 14 to 17 months, weighing 320 kg to 350 kg and 6 pre-pubertal Murrah heifers (n = 6) with an average age of 14 to 17 months, weighing between 422kg to 523kg, duly identified. To select pre-pubertal heifers, an ultrasound was performed to confirm the absence of corpus luteum (CL), ensuring the selection of animals that had not yet started cyclicity. The TAI protocol used consisted of an intravaginal implant with 0.5 mg of progesterone (P4). At the beginning of the protocol (D0), all heifers received the P4 intravaginal device, application of estradiol benzoate (BE) and prostaglandin F2 α . On (D7), the implant was removed from the Nelore heifers, and they received estradiol cypionate, prostaglandin F2 α and equine chorionic gonadotropin (eCG) intramuscularly (IM). Nelore insemination occurred on (D9), between 48 and 56 hours after removal of the P4 implant. In Murrah heifers, the implant was removed on D9, followed by the application of prostaglandin F2 α and eCG via IM. On (D11), the buffaloes received gonadotropin-releasing hormone (GnRH), and insemination was carried out on (D12), approximately 16 hours after the application of GnRH. During the TAI protocol, all heifers underwent blood collection to measure hormone levels of progesterone and estradiol. In Nelore, they occurred on days D7 and D9, while in Murrah, they were performed on days D9 and D12, by puncture of the jugular vein. At the same time, ultrasound examinations were performed to monitor follicular dynamics, monitoring the development of follicles and determining the moment of ovulation, identified by the absence of the ovulatory follicle. The study demonstrated that the mean ovulatory follicular diameter of heifers was 7.83 ± 2.25 mm in Nelore and 7.7 ± 1.63 mm in Murrah, with no significant differences ($P > 0.05$) between species. The diameter of the dominant follicle at P4 implant removal was 6.5 ± 1.59 mm in Nelore and 6.9 ± 4.97 mm in Murrah. The mean progesterone levels were 0.76 ng/mL in Nelore and 1.42 ng/mL in Murrah in the first collection, and 1.00 ng/mL and 0.52 ng/mL, respectively, in the second. Estrogen levels were 9.28 pg/mL in Nelore and 26.75 pg/mL in Murrah in the first collection, and 11.20 pg/mL and 11.59 pg/mL in the second. Although the study did not demonstrate a significant difference in follicular diameter between the two breeds, a difference was observed in reproductive responses. Nelore heifers had an ovulation rate of 100%, while Murrah heifers had only 50%. In addition, Murrah heifers had higher estrogen levels in the first collection. These findings reinforce the importance of adjusting puberty induction and FTAI protocols

according to the particularities of each breed, in order to optimize reproductive results.

Keywords: biotechnology; hormones; pre-pubertal; puberty; reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo utilizado em novilhas Nelore pré-púberes	37
Figura 2 – Protocolo utilizado em novilhas Murrah pré-púberes	38
Figura 3 – Modelo esquemático da realização dos exames ultrassonográficos para verificar a dinâmica folicular, taxa de ovulação e o horário da ovulação em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes	39
Figura 4 - Modelo esquemático da realização das coletas para verificar a dosagem hormonal em novilhas Nelore pré-púberes	40
Figura 5 - Modelo esquemático da realização das coletas para verificar a dosagem hormonal em novilhas pré-púberes	40
Murrah	pré-
Figura 6 -Escolha do teste para comparação de médias ou mediana	41
Figura 7 - Diâmetro folicular por espécie em D7, D9, D11, D12, D13.....	43
Figura 6 - Dosagem de progesterona no protocolo de IATF em Nelore e Murrah	.50
Figura 7 - Dosagem de Estradiol no protocolo de IATF em Nelore e Murrah	50
Figura 8 - Regressão linear dos níveis de Progesterona e dinâmica folicular em Nelore (N=6) e Murrah (N=6)	55
Figura 9 - Regressão linear dos níveis de Estrógeno e dinâmica folicular em Nelore (N=6) e Murrah (N=6)	56
Figura 10 - Regressão polinomial dos níveis de Estrógeno e Progesterona em Nelore (N=6)	56
Figura 11 - Regressão polinomial dos níveis de Estrógeno e Progesterona Murrah (N=6)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas descritivas das variáveis analisadas (Média e Desvio Padrão) referentes à dinâmica folicular e horário de ovulação dos animais pré-púberes.	43
Tabela 2 - Horário de ovulação estabelecido como a hora do exame	46
Tabela 3 - Dosagem hormonal (média e desvio padrão) de progesterona em novilhas pré-púberes Nelore e Murrah no D7, D9, D10, D12	47
Tabela 4 - Dosagem hormonal (Média e desvio padrão) de estrógeno em novilhas pré-púberes Nelore e Murrah no D7, D9, D10, D12	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BE** – Benzoato de estradiol
- CE** – Cipionato de estradiol
- CL** – Corpo lúteo
- D0** – Dia 0 (Dia do início do protocolo de IATF)
- D7** – Dia 7 (Sete dias após o início do protocolo de IATF)
- D9** – Dia 9 (Nove dias após o início do protocolo de IATF)
- D10** – Dia 10 (Dez dias após o início do protocolo de IATF)
- D11** – Dia 11 (Onze dias após o início do protocolo de IATF)
- D12** – Dia 12 (Doze dias após o início do protocolo de IATF)
- DG** – Diagnóstico de Gestação
- E2** – Estradiol
- eCG** – Gonadotrofina coriônica equina
- EM** – Estação de monta
- FSH** – Hormônio folículo estimulante
- g** – Gramas
- GnRH** – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- IA** – Inseminação artificial
- IATF** – Inseminação artificial em tempo fixo
- IM** – Intramuscular
- LH** – Hormônio luteinizante
- µg** – Microgramas
- mg** – Miligramas
- MN** – Monta natural
- ng/mL** – nanogramas por mililitro
- P4** – Progesterona
- PGF2 α** – Prostaglandina F2 α
- UI** – Unidade internacional
- pg/mL** – picogramas por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Puberdade em novilhas	19
2.2 Puberdade em novilhas Nelore	21
2.3 Puberdade em novilhas Murrah	21
2.4 Ciclo estral e dinâmica folicular	21
2.4.1 Fase de emergência folicular ou recrutamento	23
2.4.2 Fase de seleção folicular e divergência	23
2.4.3 Fase de dominância folicular	24
2.4.4 Fase de atresia ou ovulação	24
2.5 Ciclo estral e dinâmica folicular bovina	25
2.6 Ciclo estral e dinâmica folicular bubalina	26
2.7 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em Bovinos	27
2.8 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em Bubalinos	30
2.9 Protocolos hormonais	31
2.10 Progesterona	32
2.11 Estrógeno	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Localização	35
4.2 Animais e alimentação	36
4.3 Protocolo de IATF utilizados em novilhas Nelore pré-púberes	36
4.4 Protocolo de IATF utilizados em novilhas Murrah pré-púberes	37
4.5 Experimento 1- Dinâmica folicular em novilhas Nelore e Murrah pré púberes submetidas ao protocolo de IATF	38
4.6 Experimento 2- Dosagem dos hormônios progesterona (P4) e estradiol (E2) de novilhas Nelore e Murrah pré púberes submetidas ao protocolo de IATF	39
4.7 Análise estatística	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Dinâmica Folicular	43
5.2 Perfil de progesterona e estrógeno	49
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

No decorrer das décadas a evolução da pecuária levou o Brasil a um protagonismo econômico internacional oriundo da modernização do setor (Soares et al., 2016). Em 2023 o Brasil possuía o maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 197,2 milhões de

cabeças (ABIEC, 2024), no entanto, segundo o IBGE em 2023 o Brasil possuía 238.626.442 cabeças. Em 2020 eram aproximadamente 73,3 milhões de fêmeas em idade reprodutiva, consideradas fêmeas acima de 24 meses (Baruselli, 2020), e em 2021 eram de aproximadamente 74,9 milhões de fêmeas em idade reprodutiva (ASBIA, 2021). O Pará possui o segundo maior rebanho bovino do País, com aproximadamente 26.754.388 animais. No ranking de rebanho de búfalos, o Pará permanece na liderança, com 750.301 animais (ADEPARÁ, 2023).

O Brasil é o maior exportador e o segundo produtor de carne bovina do mundo, devido a vasta extensão de solos agricultáveis, as condições climáticas, extensão de territórios, adoção de tecnologias entre outros fatores (ABIEC, 2024). A Região Norte possui o segundo maior rebanho do país, com 55,7 milhões de cabeças, correspondente a 24,8% do total (IBGE, 2023).

Os bovinos da raça Nelore representam grande parte do rebanho bovino nacional, sendo assim a mais popular e numerosa no Brasil (ABCZ, 2019). Cerca de 80% do rebanho nacional é de animais da raça Zebu (*Bos indicus*), que são animais rústicos e altamente adaptados ao meio ambiente (ABIEC, 2022). O gado Nelore se adaptou bem às condições tropicais do país, resistente ao calor, possui excelente capacidade de aproveitar alimentos, resistência natural a parasitas e elevada longevidade reprodutiva. (ACNB, 2023). De acordo com a ACNB (2023) a raça Nelore passou por um vigoroso melhoramento genético no Brasil, direcionada quase exclusivamente à produção de carne.

A criação de búfalos é uma atividade com crescimento ascendente em todo o mundo. Segundo a FAO (2022) estima-se uma população mundial de mais de 203 milhões de cabeças em 2020. No Brasil, de acordo com as atualizações do IBGE (2024), se concentra o maior rebanho de bubalinos do mundo ocidental, a quantidade total de bubalinos é de aproximadamente 1.672.956 cabeças. Os búfalos representam uma importante fonte alternativa de proteína animal, possuem ótima conversão alimentar, aproveitando melhor as pastagens nativas de baixo valor nutritivo, em áreas de difícil utilização por outras espécies de animais. (Lourenço Júnior, 2008). Na região amazônica a bubalinocultura apresenta características prevalentemente extensivas, em áreas de várzea (Ribeiro, 2002). A maior parte do rebanho bubalino brasileiro 679.704 se encontra na Amazônia Legal. O Pará assume um papel de destaque no rebanho nacional, com aproximadamente 683.604 mil cabeças (IBGE, 2024).

Em búfalos a puberdade é um processo que pode ser influenciado por uma série de fatores ambientais e fisiológicos, sendo descrito por um início tardio em comparação com

outras espécies bovinas. Este atraso pode estar frequentemente relacionado a uma menor expressão de estro, além da sazonalidade, que pode influenciar a atividade reprodutiva dos búfalos (Neglia et al., 2020). Os búfalos se tornam animais poliestrais sazonais de dias curtos à medida que se distanciam da linha do equador (Hafez, 1954; Zicarelli e Vale, 2002). A puberdade em búfalas pode ocorrer de forma mais lenta devido a fatores como o menor desenvolvimento folicular e a necessidade de um ambiente hormonal específico para induzir a ovulação (Neglia et al., 2020).

Em bovinos a puberdade varia entre dois e três anos, pesando cerca de 300 kg, com idade média ao primeiro parto de 38 ± 5 meses. Estratégias nutricionais e genéticas podem antecipar a puberdade para 14 meses em sistemas específicos (Ferraz Jr et al., 2018). Animais *Bos taurus taurus* são mais precoces que *Bos taurus indicus*, que geralmente apresentam o primeiro parto aos 3 ou 4 anos. Essa diferença resulta do ambiente e do processo de seleção das subespécies. Para eficiência reprodutiva, é interessante que as novilhas atinjam a puberdade aos 13 meses, concebam aos 15 e tenham o primeiro parto aos 24 meses (Figueiredo et al., 2008; Sousa et al., 2018). No Brasil, as novilhas Nelore atingem a puberdade entre dois e três anos, pesando cerca de 300 kg, com idade média ao primeiro parto de 38 ± 5 meses. Estratégias nutricionais e genéticas podem antecipar a puberdade para 14 meses em sistemas específicos (Ferraz Jr et al., 2018).

Embora as fêmeas bovinas e bubalinas apresentem desenvolvimento ovariano (Baruselli et al., 1997) e ciclo estral similares (Almeida, 2019), os folículos das duas espécies atingem diâmetros máximos diferentes, possivelmente devido ao menor tamanho do ovário das bubalinas (Vittoria, 1997). Além disso, o intervalo entre o início do cio e a ovulação é maior nas bubalinas em comparação aos bovinos, exigindo, assim, um ajuste nos protocolos de inseminação para as búfalas (Riaz et al., 2018).

A eficiência da pecuária está em um expressivo crescimento na produção, resultado de aporte tecnológico e ações de sustentabilidade, o que pode ser observado na tecnificação da criação de animais (Santos et al., 2001). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma importante biotecnologia aplicada à reprodução animal e torna-se indispensável, uma vez que possibilita a disseminação de genes superiores, além do incremento no ganho genético de características desejáveis para a espécie, alcançando a melhoria no desempenho produtivo dos animais em um tempo programado (Couto, 2007). Em rebanhos de corte, verifica-se acréscimo na quantidade e na qualidade dos bezerros produzidos com a introdução de biotecnologias (Baruselli, 2019).

A manutenção da eficiência reprodutiva e a otimização da mão de obra são fatores que

contribuem para a melhoria do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos comerciais (Cunha et al., 2013). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) se tornou no Brasil uma biotecnologia bastante empregada na produção de carne bovina. Em 2021, o número de protocolos de IATF realizados no país ultrapassou 26 milhões, correspondendo assim a 93,3% das inseminações artificiais (Baruselli et al., 2021). A combinação de estrógeno e progesterona associados para sincronizar a ovulação das fêmeas é o protocolo de IATF que mais se utiliza no Brasil (Agroadvance, 2022).

Diante disso, o objetivo deste experimento foi induzir a puberdade, avaliar a dinâmica folicular e o perfil dos hormônios progesterona (P4) e estradiol (E2) em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes, empregando o uso da biotecnologia de inseminação artificial em tempo fixo, monitorando o desenvolvimento dos folículos e determinando o horário da ovulação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Puberdade em novilhas

A manifestação da puberdade e a maturação sexual em novilhas dependem da interação entre idade e peso corporal. O aumento de peso e o estágio da vida em que ocorre também podem afetar a idade em que as novilhas atingem a puberdade e a primeira concepção (Canellas et al., 2012). Tanto o ganho de peso quanto o peso corporal, juntamente com a idade da primeira concepção, estão ligados a outras características de relevância econômica, como carcaça e escores visuais. O desenvolvimento dos tecidos e a composição corporal das novilhas de corte estão diretamente ligados à sua precocidade sexual, o que impacta significativamente a lucratividade econômica dos sistemas de produção (Canellas et al., 2012). Essas características podem atuar como um fator limitante para a sustentabilidade desses sistemas (Brumatti et al., 2011; Moorey e Biase, 2020). Estudos recentes têm enfatizado a importância das características reprodutivas no manejo e sucesso dos sistemas de criação (Bonamy et al., 2019; Brunes et al., 2020) .

Uma maneira eficaz de elevar os índices produtivos e econômicos do rebanho brasileiro é antecipar a vida reprodutiva das fêmeas, reduzindo a idade de puberdade e, por conseguinte, a idade do primeiro parto (Brunes et al., 2020). Aumentar a fertilidade pode ser conseguido por meio de melhorias na alimentação e no manejo dos animais (Qureshi et al., 2007).

No momento em que ocorre a primeira ovulação no qual os ciclos estrais iniciam, pode-

se definir como início da puberdade das novilhas bovinas e bubalinas. Dessa forma, este evento tem sido classificado como o primeiro período de estro, seguido por ovulação ou início da ciclicidade reprodutiva (Sá Filho et al., 2017). A puberdade não se limita apenas no desenvolvimento anatômico completo do corpo, se expressa também sempre que o funcionamento fisiológico de algumas glândulas endócrinas se torna completo, e se associam com o suficiente desenvolvimento estrutural do trato reprodutivo da fêmea (Perry, 2016). O aparecimento da puberdade está estreitamente relacionado à condição alimentar sob a qual são mantidas as bezerras após o desmame, ou seja, está relacionada ao desenvolvimento corporal, sendo mais precoce nos animais mantidos em melhores condições nutricionais (Funston et al., 2012).

Os mecanismos endócrinos são modificados para que as bezerras no pós-natal não ativem o sistema reprodutivo até que possuam desenvolvimento de aproximadamente 65% a 70% do peso adulto, compatível com a reprodução, e sinalize que o gasto de energia para o crescimento e o desenvolvimento já não são prioridades para o seu organismo, assim permitindo que parte dos nutrientes sejam utilizados para gestação, parto e lactação (Sammelmann et al., 2001). O crescimento folicular pode ser induzido com o emprego de diferentes hormônios como a progesterona, o estradiol e a combinação destes, e também com o GnRH e seus análogos (Thatcher et al., 2001). O uso de protocolos hormonais em novilhas com intuito de induzir, sincronizar e antecipar o estro possui resultados positivos.

Em fêmeas imaturas, os pulsos de gonadotrofina pré-ovulatórios não ocorrem espontaneamente até a puberdade. Esse bloqueio ocorre devido ao feedback negativo do estradiol (Gordon, 2002). Antes da idade da puberdade, o estradiol é extremamente eficaz na supressão da secreção pulsátil de LH, e perde a eficácia à medida que se aproxima o tempo da puberdade. A progesterona então assume o papel do principal controle de feedback inibitório da secreção de GnRH (Foster e Karsch, 1976). Durante a transição da fase pré-púbere para a fase puberal há uma redução evidente na sensibilidade à inibição da secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo estradiol. Como resultado, ocorre secreção de GnRH e o aumento na frequência do pulso de hormônio luteinizante (LH), o que interfere no processo da primeira ovulação. Esse pico característico do LH é um dos principais preditores do início da puberdade (Cardoso et al., 2018; Gordon, 2002).

Progestágenos são compostos similares a P4, podem ser administrados por via oral, implantes subcutâneos de norgestomet, ou dispositivos intravaginais contendo P4. O uso destes

compostos reduz a quantidade dos receptores de E2 no hipotálamo, reduzindo a retroalimentação negativa desse hormônio na liberação de GnRH, resultando em um aumento na liberação de LH. Este mecanismo é responsável pela indução da puberdade em tratamentos com progestinas (Day et al., 1998). A progesterona, quando utilizada em novilhas, inclusive pré-púberes, é capaz de iniciar a atividade ovariana cíclica, atuando como indutora nesse processo de antecipação da puberdade, que é o principal objetivo para que ocorra a eficiência reprodutiva (Pfeifer et al., 2009).

2.2 Puberdade em novilhas Nelore

Pesquisas mostram que a influência genética influencia fortemente a idade em que as fêmeas bovinas entram na puberdade. Nas novilhas Nelore (*B. indicus*), a ovulação em resposta ao LH exógeno ocorre em 33,3% dos folículos com 7,0-8,4 mm, 80,0% com 8,5-10 mm e 90,0% acima de 10 mm. A puberdade em Nelore é uma etapa crucial para determinar o início da vida reprodutiva e, conseqüentemente, o potencial produtivo ao longo da vida dos animais. Em Nelore, vários fatores podem influenciar o início da puberdade, como a genética, nutrição, manejo e características corporais, como espessura de gordura subcutânea e escore corporal (Barruselli, 2022). O estudo de Catussi et al., (2022) sugere que novilhas com manejo nutricional adequado e selecionadas geneticamente para precocidade sexual apresentam uma maior probabilidade de atingir a puberdade mais cedo, resultando em uma melhor taxa de prenhez aos 14 meses. Em bovinas o desenvolvimento folicular é regulado por uma complexa interação hormonal, onde níveis adequados de hormônios, como LH e FSH, são essenciais para o crescimento dos folículos até o estágio ovulatório (Baruselli et al., 2022).

Desta maneira, existe uma constante procura por técnicas que permitam a melhora dos índices de eficiência reprodutiva da fêmea Nelore (Araujo et al., 2018).

2.3 Puberdade em novilhas Murrah

Diferentemente dos bovinos, as búfalas alcançam a puberdade e a maturidade sexual mais tardiamente, geralmente entre 24 e 30 meses, como ocorre com as raças Murrah (EMBRAPA, 2019). Em búfalos a puberdade é um processo que pode ser influenciado por uma série de fatores ambientais e fisiológicos, sendo descrito por um início tardio em comparação com outras espécies bovinas. Este atraso pode estar frequentemente relacionado a uma menor expressão de estro, além da sazonalidade, que pode influenciar a atividade reprodutiva dos búfalos (Neglia et al., 2018). Os búfalos se tornam animais poliestrais sazonais de dias curtos

à medida que se distanciam da linha do equador (Hafez, 1954; Zicarelli e Vale, 2002). A puberdade em búfalas pode ocorrer de forma mais lenta devido a fatores como o menor desenvolvimento folicular e a necessidade de um ambiente hormonal específico para induzir a ovulação (Neglia et al., 2018).

2.4 Ciclo estral e dinâmica folicular

O ciclo estral engloba os eventos reprodutivos que ocorrem entre dois períodos de receptividade sexual ou ovulações, sendo controlados por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que se inter-relacionam para promover uma dinâmica folicular. Esse processo permite que um folículo se desenvolva até a maturação, tornando-se apto para ovular e produzir uma célula viável para fecundação (Perera, 2011).

O ciclo estral divide-se nas fases folicular e luteínica, definições com base na estrutura predominante em cada uma, sendo o folículo na fase folicular e o corpo lúteo na fase luteínica, cada fase inclui duas etapas: a fase folicular, de curta duração, corresponde a cerca de 20% do ciclo e engloba o proestro e o estro enquanto a fase lútea representa aproximadamente 80% do ciclo, abrangendo o metaestro e o diestro. (Singh et al., 2000).

No proestro, ocorre uma queda nos níveis de progesterona devido à regressão do corpo lúteo, acompanhada pelo desenvolvimento folicular e elevação dos níveis de estradiol no sangue. Esse processo é impulsionado pela liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, que estimula secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), esses hormônios em altas concentrações promovem o desenvolvimento e maturação dos folículos, aumentando a produção de estradiol e desencadeando a fase de estro (Roelofs et al., 2006).

O estro, fase mais conhecida do ciclo estral, é marcado pela receptividade sexual e por sinais característicos, como turgidez uterina, colo relaxado, vagina e vulva com sinais de hiperemia e edema, além da presença de muco (Baruselli et al., 2007).

O metaestro, etapa final do estro, é caracterizado pela ovulação (Roelofs et al., 2006). Após a liberação do óvulo, as células da parede folicular se proliferam, formando o corpo lúteo (Ferreira et al., 2009). Em seguida, ocorre a reorganização do tecido lúteo, aumento do fluxo sanguíneo para o ovário e crescimento do corpo lúteo, promovendo uma elevação gradual na síntese de progesterona, que caracteriza o diestro (Andrade et al., 2012).

O número de ondas por ciclo estral pode estar associado com o comprimento do ciclo e com a duração da fase luteínica (Ginther et al., 1989) ou progesterônica, período que tem início a partir da ovulação até o momento da regressão do corpo lúteo (metaestro e o diestro)

(Macmillan; Burke, 1996; Ferreira, 2010). Cada onda de crescimento folicular possui quatro fases: fase de recrutamento ou emergência, fase de seleção ou divergência, fase de dominância e fase de atresia ou ovulação do folículo dominante (Ginther et al., 1997).

A dinâmica folicular ovariana é o processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário, esse processo envolve o desenvolvimento sincronizado de um grupo de folículos, denominado onda folicular (Ginther et al., 1989).

Um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e inicia a fase de crescimento por cerca de três dias (Ginther et al., 2003), apenas o folículo dominante dessa onda continua seu desenvolvimento e os outros entram em atresia (Lucy et al., 1992), nesse momento se estabelece o fenômeno da divergência folicular. (Ginther et al., 1989). A manutenção e regressão do folículo dominante se associa com as mudanças nas concentrações de progesterona e hormônio luteinizante (Hafez, 1995). O folículo dominante de uma onda pode entrar em regressão ou atresia com a presença de progesterona acima de 1ng/ml, ou continuar seu crescimento até a ovulação quando a concentração de progesterona cai durante e após o processo de luteólise. Quando não há fertilização do oócito ovulado, o ciclo se repete (Binelli et al., 2006).

2.4.1 Fase de emergência folicular ou recrutamento

A fase de emergência folicular é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos que podem continuar a crescer até aproximadamente 6 a 8 mm de diâmetro, quando passam pela seleção folicular. Durante essa fase, um grupo de folículos cresce simultaneamente no ovário, estimulado pelo pico de liberação de FSH (Adams et al., 1992), apresentando em torno de 4 mm de diâmetro, sendo adaptáveis e dependentes dessa gonadotrofina (Ginther et al., 2002). O FSH vai permitir que os folículos continuem o seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente a capacidade esteroidogênica dos folículos (Adams et al., 1992). Nessa fase, quando os folículos atingem por volta 3 a 4 mm, coincide com a detecção da enzima aromatase nas células da granulosa (Ginther et al., 2003; Ferreira, 2010).

2.4.2 Fase de seleção folicular e divergência

A fase de seleção ocorre durante a onda folicular é o processo em que alguns folículos

continuarão crescendo, para ovular ou entrar em atresia posteriormente. Esses folículos possuem em torno de 4 mm de diâmetro, sendo responsivos e dependentes de FSH, permitindo que os folículos continuem seu crescimento e proliferação celular, ocorrendo também o aumento gradual da sua capacidade esteroidogênica (Adams et al., 1992; Ginther et al., 2002; Ferreira, 2010).

Apenas um folículo continua o seu desenvolvimento e se torna o folículo dominante, os demais folículos conhecidos como subordinados, entram em processo de atresia (Lucy et al., 1992), assim, ocorrendo o fenômeno da divergência folicular. Nos mecanismos de seleção provavelmente o folículo selecionado apresenta uma resposta mais precocemente ao estímulo provido pelo hormônio luteinizante - LH (Driancourt, 2001; Sartori et al., 2001).

Alguns folículos anteriormente recrutados continuarão seu crescimento (6 – 10 mm), e o início da dominância ocorre com o fim dessa fase. Ocorre a seleção e após se inicia a fase da divergência, onde há uma maior diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos da onda folicular, os folículos menores iniciam o processo de atresia e são denominados folículos subordinados e o folículo maior continua crescendo e se torna o dominante. O processo da divergência pode possuir vários fatores de ativação intrafoliculares, como os esteróides ovarianos, o sistema IGF, peptídeos inibina - A / ativina - A, receptores para gonadotrofinas, fatores angiogênicos entre outros fatores. Antes do início da divergência em bovinos as concentrações de IGF-1 livre e estrógeno no fluido folicular aumentam mais no futuro folículo dominante do que nos folículos subordinados (Ferreira, 2010).

2.4.3 Fase de dominância folicular

Quando o folículo com maior diâmetro possui a capacidade de inibir o crescimento dos folículos menores, conhecidos como folículos subordinados, ocorre nessa etapa a dominância folicular. Supõe-se que o folículo selecionado para dominância desenvolva receptores nas células da granulosa primeiro que os demais, geralmente ocorre quando atinge cerca de 8 a 9 mm de diâmetro. A diminuição de concentrações do FSH limita o crescimento folicular, assim a maioria dos folículos recrutados entram em atresia (Ginther et al., 2001; Ferreira, 2010).

A dominância folicular é estabelecida quando um folículo atinge um tamanho maior do que os dos folículos subordinados, quando o folículo dominante apresenta diâmetro maior em cerca de 1 a 2 mm em relação ao segundo maior folículo da onda inicia o processo de dominância, diminuindo o crescimento dos folículos subordinados o fim da onda folicular atual é marcado pela perda da dominância do folículo dominante e se dá início a próxima onda

(Ferreira, 2010).

Além do LH, outros fatores, como o IGF-1 e o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), também podem contribuir para reforçar a dominância. O IGF-1, por exemplo, pode mediar parcialmente a indução de receptores de LH, enquanto o VEGF estimula a angiogênese. O folículo dominante é muito sensível ao LH, e o aumento na produção de progesterona pelo corpo lúteo reduz em cerca de 50 % a frequência do LH, o que pode provocar a atresia do folículo dominante e o surgimento de uma nova onda folicular (Ferreira, 2010).

2.4.4 Fase de atresia ou ovulação

É comum que ocorra duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas durante o ciclo estral, sendo a última, a onda ovulatória. A ovulação ocorre somente quando o folículo dominante está presente no momento da regressão luteínica (Adams; Pierson, 1995).

Quando ocorre a presença de um corpo lúteo funcional no ovário, há uma ampla produção de progesterona. A progesterona exerce um efeito de retroalimentação negativa (feedback negativo) no eixo sistema nervoso central - hipotálamo - hipófise- ovário, que mantém a amplitude e frequência dos pulsos de LH, baixos, inibindo os processos de maturação final do folículo e ovulação, tornando o folículo dominante ovulatório (Ginther et al., 1996).

Há um aumento da concentração de estrógeno quando ocorre o crescimento do folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva (feedback positivo) para a secreção do GnRH e como consequência um pico de LH. O folículo selecionado continua crescendo e sua capacidade de produzir estrógeno e inibina aumenta em resposta ao LH, o que o torna dominante. Em consequência ocorre a queda das concentrações de FSH a concentrações basais, e posteriormente ocorre a ovulação (Fortune, 1993; Ginther et al., 1999).

No folículo ovulado ocorre mudanças funcionais e estruturais para dar origem ao corpo lúteo (CL). O mesmo desenvolve-se rapidamente e secreta quantidades crescentes de progesterona. Quando não ocorre a prenhez, entre os dias 16-18, ocorre o processo de luteólise com a regressão do CL e consequente queda das concentrações plasmáticas de progesterona (Adams, 1995; Bo et al.; 1995; Fortune et al., 2004).

2.5 Ciclo estral e dinâmica folicular bovina

Em fêmeas bovinas, o ciclo estral é regulado por uma série de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, controlados por hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, ovários e útero (Hafez e Hafez, 2004) por mecanismos intra-ovarianos que irão estabelecer uma dinâmica folicular permitindo o desenvolvimento de um folículo maduro, apto a ovular em momento apropriado e produzir, uma célula pronta para ser fecundada (Callejas, 2001).

O ciclo estral bovino ocorre no intervalo de estros (período que a fêmea demonstra disposição para o acasalamento), ou intervalo entre ovulações com duração de 21 dias 23 em média (18-24 dias) (Ferreira, 2010). É dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. Sendo as fases de proestro e estro denominadas de fase folicular ou estrogênica devido a predominância de estradiol (E2), tendo início com o crescimento folicular até a ovulação. Já as fases de metaestro e diestro são denominadas de fase luteínica ou progesterônica em que o hormônio predominante é a progesterona (P4), compreende o período da formação do corpo lúteo (CL) até a luteólise (Reece, 2017).

O ciclo estral dos bovinos apresenta, geralmente, duas ou três ondas de crescimento folicular (Ginther et al., 1996), e raramente apresenta uma quarta onda.

2.6 Ciclo estral e dinâmica folicular bubalina

Nas regiões distantes da linha do Equador, as búfalas apresentam comportamento poliestrual sazonal, ciclando nos dias curtos e interrompendo a atividade reprodutiva no verão. Perto do Equador, no entanto, mantêm um ciclo contínuo durante o ano todo (Vale & Ribeiro, 2005).

Em bubalinos a duração do ciclo estral pode variar de 16 a 33 dias, com duração média de 21 a 24 dias, havendo variação entre as raças (Siqueira et al., 2009) e é dividido em quatro fases: o proestro, estro, metaestro e diestro. Durante o proestro, ocorre o desenvolvimento folicular e a produção de estrogênio, que prepara o útero para receber o embrião. No estro, há o pico de LH (hormônio luteinizante) e ocorre a ovulação. No metaestro, ocorre a formação do corpo lúteo, que é responsável pela produção de progesterona. No diestro, a progesterona continua a ser produzida e o útero fica preparado para a gestação (Santos et al., 2015). Os búfalos possuem uma ciclicidade reprodutiva geralmente influenciada pela sua exposição diária à luz, assim sendo considerados animais sazonais (Bittman e Karsch, 1984; Zicarelli, 1994; Zicarelli e Vale, 2002). As variações de luminosidade diária ao longo do ano influenciam na reprodução da espécie bubalina que é sazonalmente poliéstrica e sensível ao fotoperíodo.

Os hormônios sexuais das búfalas são sintetizados e liberados através do eixo hipotálamo-adenohipófise de acordo com as variações de luminosidade diária ao longo do ano (Bittman et al., 1985; Malpaux et al., 2001, Phogat et al., 2016). A informação fotoperiódica é realizada por uma complexa via nervosa e endócrina para modular a atividade reprodutiva. A informação da luz recebida na retina é enviada via aferência sensorial nervosa e transformada em sinal endócrino pela glândula pineal que modula a secreção de melatonina (Phogat et al., 2016). A melatonina comanda os efeitos sazonais na função reprodutiva, é um hormônio sintetizado pela glândula pineal, que inibe a produção dos hormônios GnRH, FSH e LH (Bittman e Karsch, 1984; Zicarelli, 1994; Zicarelli e Vale, 2002).

A melatonina é o hormônio responsável por sinalizar a variação do claro/escuro em bubalinos, controlando o começo ou o fim da atividade ovariana cíclica. Os níveis de melatonina possuem um ciclo de 24 horas, e apresentam um sinal endócrino que modifica e alerta o padrão de liberação dos outros hormônios que estão envolvidos na regulação da função reprodutiva. (Zicarelli, 1994). Os indicativos mais eficientes de sensibilidade ao fotoperíodo em búfalas podem ser vistos a partir dos níveis de melatonina e seu aumento na ausência de luz (Parmeggiani et al., 1992). O tempo de luminosidade é negativamente ligado ao número de búfalas demonstrando comportamento de estro, e curtos períodos de escuridão artificial diminuem o problema de anestro durante os períodos de dias longos (Singh et al., 2000). O hormônio melatonina possui papel fundamental sobre a regulação da liberação de GnRH e a secreção das gonadotrofinas e para a regulação sazonal da atividade ovariana de búfalas (Zicarelli, 1997).

A espécie bubalina tem início da atividade sexual quando à diminuição da luminosidade diária (final do verão e início do outono) e entram em anestro reprodutivo no fim do período de inverno (Rocha et al., 2011; Abecia et al., 2012). Regiões onde há maior variação diária na duração das horas de luz há maior manifestação de cio durante o outono e inverno (Baruselli, 1994; Zicarelli, 1994). Por outro lado, os animais criados em rebanhos localizados próximos à linha equatorial demonstram sazonalidade reprodutiva decorrentes de fatores nutricionais (Bastianetto e Escrivão, 2005).

Algumas características específicas das bubalinas em relação à dinâmica folicular incluem a presença de folículos pequenos persistentes, conhecidos como folículos afetivos, que podem interferir na seleção do folículo dominante e na presença de um período refratário pós-ovulatório, que impede a ovulação imediata de outro folículo. Além disso, a evolução do óvulo pode ocorrer em diferentes possibilidades de desenvolvimento folicular, o que pode

afetar a qualidade do óvulo e a taxa de fertilização. (De Rosa et al., 2010).

2.7 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em Bovinos

O uso de biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), aliado a um gerenciamento eficiente, pode ser uma solução viável para melhorar os índices reprodutivos, melhorando especialmente as taxas de prenhez e concepção (Dahlen et al., 2014) . Além disso, a IATF pode representar uma estratégia vantajosa para aumentar a lucratividade na bovinocultura (Souto et al., 2019). A aplicação dessas biotecnologias também facilita uma propagação mais rápida de material genético de alta qualidade (Baruselli et al., 2007), promovendo a redução do intervalo entre partos, o aumento da taxa de serviço e a redução do período de serviço. Outro benefício significativo é a indução do estro em fêmeas acíclicas, eliminando a necessidade de detecção diária do estro (Bilbao et al., 2019; Caetano & Caetano Júnior, 2015).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é considerada uma técnica altamente eficaz, principalmente pela flexibilidade de adaptar seus protocolos às necessidades específicas de cada rebanho. Esses protocolos baseiam-se em intervenções hormonais, que promovem a sincronização da ovulação em um grande grupo de fêmeas, alinhando o ciclo estral das matrizes e eliminando a necessidade de monitoramento contínuo do estro (Castilho, 2015). Essa sincronização controlada permite ao produtor realizar a inseminação de um grupo definido de animais no mesmo dia, tornando o manejo reprodutivo mais eficiente e previsível (Furtado et al., 2011).

Em rebanhos bovinos, o uso da IATF permite que toda a reprodução fique sob controle do produtor, possibilitando a inseminação de um grande número de matrizes em um curto período de tempo. Além de programar a inseminação e o nascimento dos bezerros, há o benefício de aumentar o número de bezerros nascidos em período favorável e melhorar o aproveitamento da mão de obra (Baruselli, 2004). A implementação de biotecnologias reprodutivas também possibilita uma difusão mais rápida de material genético de alta qualidade (Baruselli et al., 2007), reduzindo o intervalo entre partos, aumentando a taxa de serviço e encurtando o período de serviço. Outro benefício é a indução do estro em fêmeas que não estão ciclando naturalmente, sem a necessidade de observação diária do cio (Bilbao et al., 2019; Caetano & Caetano Júnior, 2015).

As taxas médias de prenhez em programas de IATF são geralmente em torno de 50% para cada protocolo. Em propriedades com manejo sanitário, nutricional e reprodutivo bem estruturado, essa taxa pode aumentar para até 60%. Quando os cuidados são extremamente rigorosos e otimizados, é possível atingir taxas de prenhez de até 70% (Baruselli, 2013).

A eficácia do processo de inseminação artificial em bovinos de corte depende diretamente da observação precisa do cio e da identificação exata do momento ideal para a deposição do sêmen durante a inseminação artificial (Martins, 2009). A previsão econômica da IATF depende também de fatores como a qualidade do sêmen, a experiência do inseminador e o manejo nutricional e sanitário dos animais. O produtor precisa fornecer pastagens de qualidade, sal mineral e água à vontade, além de implementar um manejo sanitário eficaz para que o rebanho responda bem à técnica (Vasconcelos et al., 2006; Vilela et al., 2009).

Com o aprimoramento do conhecimento da fisiologia reprodutiva das fêmeas, foram desenvolvidos protocolos hormonais para sincronizar a ovulação e realizar a inseminação artificial em dias e horários programados, como ocorre na IATF (Meldau, 2007). A biotecnologia permite ainda a utilização de sêmen de touros geneticamente modificadas, acelerando o ganho genético e produtivo, o que gera bezerros mais produtivos e úteis e aumenta o retorno econômico ao produtor. Além disso, é possível evitar a transmissão de doenças durante a cópula, possibilitando um controle mais eficaz dos rebanhos e uniformidade nos bezerros produzidos (Vishwanath, 2003; Rodgers et al., 2015; Baruselli et al., 2017).

A IATF foi desenvolvida com o objetivo de facilitar o uso da inseminação artificial, aumentando a eficiência reprodutiva das matrizes e eliminando a necessidade de detecção de estro, o que possibilita a inseminação de vacas no anestro (Rhodes et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2007). A técnica permite ainda antecipar e concentrar o parto das fêmeas no início da estação de monta, o que contribui para o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva da propriedade (Baruselli et al., 2018).

Atualmente, o protocolo da IATF mais difundido consiste na associação de uma fonte de progesterona exógena (P4), estrógeno e $PGF2\alpha$, podendo incluir eCG e GnRH. Esse protocolo geralmente se inicia com a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona para simular uma fase lútea (Bó et al., 2015). O tratamento hormonal dura de 10 a 11 dias e é seguido pela inseminação artificial de todos os animais sincronizados (Sá, 2009).

O protocolo de IATF conhecido como Ovsynch, combina o uso de GnRH e $PGF2\alpha$ para o controle do corpo lúteo e integrando dispositivos liberadores de hormônios. Esse protocolo começa com a aplicação de GnRH no primeiro dia, sincronizando a onda de crescimento folicular, promovendo a ovulação ou a luteinização do folículo dominante. No sétimo dia, administrou-se uma dose de $PGF2\alpha$ para induzir a luteólise, o que reduz os níveis séricos de progesterona (P4). No nono dia, uma nova dose de GnRH é aplicada para estimular o pico de LH e sincronizar a ovulação, permitindo que a inseminação artificial seja realizada

entre 12 e 24 horas após essa última administração (Mongelli et al., 2021). No Brasil, pela característica dos animais criados e manejo, o protocolo Ovsynch é pouco utilizado.

A IATF oferece inúmeras vantagens em comparação com métodos como a estação de monta. Entre seus benefícios estão a padronização dos bezerros produzidos, o controle de doenças sexualmente transmissíveis e a possibilidade de cruzamentos industriais entre raças zebuínas e taurinas. A técnica também reduz os riscos de acidentes para a fêmea e o touro durante a monta e diminui as consequências no parto ao possibilitar a escolha de touros com características mais adequadas. Além disso, permite a escolha do momento da inseminação sem a necessidade de detecção do cio, entre outras vantagens (Silva et al., 2021).

2.8 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em Bubalinos

Apesar das peculiaridades ambientais da região amazônica para a bubalinocultura, o uso da Inseminação artificial em tempo fixo (IATF), mesmo lentamente, vem alcançando bons resultados (Ribeiro, 2020). Com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos bubalinos, diversas técnicas de reprodução têm sido utilizadas em búfalas, dentre elas a IA e IATF.

O protocolo hormonal denominado Ovsynch, se baseia na utilização de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandinas (PGF) tem se revelado um meio prático e eficiente para incrementar a IA em bovinos (Pursley et al., 1997). Com base em estudos prévios com a inclusão de progesterona (P4) em protocolos de IATF em bovinos de corte, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Pietro Baruselli iniciou em bubalinos uma série de estudos sobre o uso de P4. O implante intravaginal de P4 é utilizado para manter as concentrações plasmáticas de progesterona durante um período específico. Quando essas concentrações atingem níveis sub-luteais durante o tratamento, ocorre um aumento na frequência dos pulsos de LH, o que promove o crescimento folicular e previne a atresia do folículo dominante (Stock; Fortune, 1993; Sávio et al., 1993). Este mecanismo vai permitir o crescimento e a maturação do folículo dominante capaz de ovulação, inclusive em animais em anestro (Rhodes et al., 2002).

Em búfalas o protocolo consiste no implante intravaginal de P4, associado a injeção intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE), no dia zero (D0); tal associação permite a atresia dos folículos presentes no ovário e uma subsequente nova onda folicular sincronizada surge. No nono dia (D9) o implante de P4 é removido e aplicado via IM prostaglandina (PGF2a), e gonadotrofina coriônica equina (eCG). No décimo primeiro dia

(D11), é aplicado GnRH às 16h para indução da ovulação e a IATF é realizada 16h após as 8h da manhã. A administração de eCG no momento da remoção do implante de P4 pode aumentar a taxa de ovulação, melhorar a produção de P4 pelo corpo lúteo no início do diestro e, conseqüentemente, elevar as taxas de prenhez (Carvalho et al., 2013).

A inseminação artificial é uma das principais biotecnologias utilizadas em espécies domésticas, sendo essencial para a disseminação de material genético paterno que é de alta qualidade. No entanto, apenas 1% das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva são inseminadas artificialmente (IBGE, 2013). Esse baixo índice é atribuído à dificuldade em identificar o estro, que pode durar entre 6 e 48 horas (Baruselli, 1994; Porto Filho et al., 2004), tornando sua detecção desafiadora.

Protocolos de sincronização que permitem a realização da IATF sem a necessidade de observar o estro foram desenvolvidos, facilitando e otimizando seu uso na biotecnologia. Em fêmeas bubalinas cíclicas (com corpo lúteo presente) durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno), a sincronização do cio e da ovulação por métodos hormonais (Ovsynch) tem apresentado resultados satisfatórios em torno de 50% (Baruselli, 1999; Chaikhun et al., 2010; Almeida et al., 2020), e em algumas situações, superiores a 60% para o uso de IATF (Campanile et al., 2013).

A indução do cio e da ovulação, seguida da IATF, podem ser realizados em manejos, de duas a quatro vezes, com a inseminação podendo ser realizada desde o quarto dia, no décimo dia, no décimo primeiro ou no décimo segundo dia. O protocolo de quatro manejos é o mais utilizado em bubalinos na Amazônia atualmente, que consiste na IATF no décimo segundo dia (D12), pela manhã (Barbosa, 2019). O protocolo de quatro manejos se dá com a implantação do dispositivo intravaginal de P4 (1,2mg) e 2,0mg de BE, no D0; no D9 ocorre a aplicação de 0,265mg de closprostenol sódico e 300 UI de eCG; no D11 0,1mg de GnRH e no D12 a IATF (Neves Souza, 2019).

2.9 Protocolos hormonais

Na constante busca de atualizar as ferramentas o manejo reprodutivo sofreu desenvolvimentos com intuito de eliminar a detecção de estro e aumentar a eficiência de manipulação animal, focando no controle do corpo lúteo (CL), em animais cíclicos, e da dinâmica folicular, resultando em diversas formas de realizar protocolos mais econômicos e práticos na sincronização da ovulação (Lamb et al., 2010).

O objetivo dos protocolos de sincronização utilizados na IATF é induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o

estágio pré-ovulatório, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de progesterona exógena (implante auricular ou dispositivo intravaginal) e endógena (prostaglandina F2 α) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente (Baruselli et al., 2007).

A ovulação do folículo dominante depende da remoção da fonte exógena de progesterona (após 5 a 9 dias), juntamente com a aplicação de um indutor de ovulação. Os principais fármacos utilizados como indutores da ovulação em programas de IATF são: análogos (gonadorelina) ou superanálogos (buserelina, lecirelina, fertirelina) do GnRH e ésteres de estradiol, como o benzoato de estradiol (BE) e o cipionato de estradiol (CE). Cada um desses fármacos apresenta um intervalo específico entre sua aplicação e a ovulação, portanto a IATF deve ser realizada de acordo com o indutor utilizado (D'Ávila et al., 2019).

O uso de protocolos de sincronização baseados na utilização de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandinas (PGF) tem se revelado prático e com eficiência para incrementar a IA em gado de corte e leite (Pursley et al., 1997). Os objetivos originais da utilização desse protocolo é controlar hormonalmente o aparecimento de uma nova onda folicular; o tempo de vida do corpo lúteo espontâneo e induzido; e o tempo da ovulação do folículo dominante (Nur et al., 2013; Pursley & Bello, 2007).

O protocolo de Ovsynch é uma combinação de três hormônios administrados em tempos predeterminados e com objetivos já estabelecidos. Na primeira administração do GnRH (GnRH-1) se busca alcançar a ovulação do folículo dominante (presente em aproximadamente 70% dos casos) e emergência de uma nova onda folicular 1,5 a 2 dias depois; após 7 dia é feita a administração de PGF2 α , para que ocorra a indução de luteólise, permitindo o crescimento e maturação do folículo dominante; 48 horas depois realiza-se a administração de GnRH (GnRH-2) para que ocorra a indução de um pico de hormônio luteinizante (LH) resultando na ovulação do folículo dominante (pré-ovulatório) aproximadamente 28 horas após a administração de GnRH-2. Recomenda-se a realização da IATF com 16 a 20 horas após a administração de GnRH-2 (Pursley et al., 1995)

2.10 Progesterona

A progesterona é um esteróide. Um hormônio com fundamental papel na regulação do funcionamento do sistema reprodutor feminino, liberada principalmente pelo corpo lúteo, mas há um período da gestação em que é liberada pela placenta. (Reece, 1996), A P4 desempenha algumas funções, atua no preparo do endométrio para a implantação e manutenção da prenhez, com aumento da atividade das glândulas secretoras do endométrio e inibição de motilidade do

miométrio; auxilia no desenvolvimento dos alvéolos da glândula mamária; inibe o cio e do pico pré-ovulatório

em altos níveis de P4, por isso possui um papel importante na regulação hormonal do ciclo estral (Hafez e Hafez, 2004).

A progesterona (P4) é um hormônio derivado do colesterol e secretado pelo corpo lúteo (CL) e placenta (Wiltbank et al., 2014). A enzima P450 é responsável pela conversão do colesterol em P4, que converte o colesterol em pregnenolona e a 3 β hidroxiesteroide desidrogenase que finaliza o processo transformando a pregnenolona em progesterona (Wiltbank et al., 2014). A modulação do crescimento folicular, o bloqueio da expressão do estro e ovulação através da ação hipotalâmica, a preparação do endométrio para uma nova gestação e manutenção da mesma, são funções que a P4 desempenha no metabolismo (Clemente et al., 2017).

A razão entre a produção do corpo lúteo e o metabolismo em células hepáticas irá determinar a concentração circulante de P4 no organismo. O aumento da P4 antes da IA se obtém através da indução de uma ovulação extra, produzindo um CL acessório ou pela inserção de dispositivo intravaginal com liberação de P4. É fundamental que após esse aumento durante o crescimento folicular antes da IA, ocorra uma rápida queda dos níveis de P4 próximo ao momento da ovulação, por meio de uma luteólise, sendo assim, os índices de fertilidade não serão prejudicados (Ribeiro, 2012).

O momento de regressão luteal determina o número de ondas em um ciclo, tendo em vista que a progesterona apresenta efeitos inibitórios sobre o crescimento folicular. As fêmeas que apresentam duas ondas de desenvolvimento folicular apresentam o ciclo estral e uma fase luteal mais curta (Fortune et al., 1991). A alta concentração circulante de P4 influencia no crescimento folicular, pode resultar em efeitos benéficos nos ovócitos em desenvolvimento e conseqüentemente atua sobre o desenvolvimento embrionário, gerando impacto positivo nos índices de fertilidade, sendo notáveis nos exames de ultrassonografia no diagnóstico de gestação. (Chebel, 2010).

Vacas em anestro podem ter a ciclicidade induzida quando sujeitadas ao uso de progesterona de forma exógena. Atualmente existem no mercado produtos que liberam progesterona (dispositivos intravaginais) e progestágenos (implantes auriculares) de forma eficiente com o propósito de sincronizar o estro e a ovulação. Com base no protocolo que será estabelecido estes produtos são utilizados em um período de 7 a 12 dias. O intuito do uso deste hormônio nesses métodos é manter altos os níveis de progesterona suprimindo a liberação

exógena do hormônio luteinizante (LH), simulando uma fase luteínica do ciclo estral. A regressão luteínica é obtida quando ocorre a aplicação de estradiol no começo do tratamento ou quando há uma administração de prostaglandina no momento da remoção do implante (Baruselli et al., 2006).

2.11 Estrógeno

O estrógeno (E2) é um hormônio esteroide, carregado via circulação sanguínea por proteínas ligadoras, distribuídas por todo o organismo. Nos bovinos sua síntese ocorre funções de promove o comportamento sexual; possui efeitos anabólicos; apresentam tanto feedback negativo quanto positivo no controle da liberação de FSH e LH pelo hipotálamo, sendo que o feedback negativo atua no centro tônico e o feedback positivo no centro pré-ovulatório; interfere em aspectos físicos secundários femininos (Hafez e Hafez, 2004).

O hormônio estrógeno atua nos centros controladores da onda pré-ovulatória, causando o efeito de feedback positivo, uma vez que não haja presença de progesterona sua concentração plasmática elevada estimula a liberação de GnRH e LH, propiciando a indução da manifestação do estro e posteriormente a ovulação do folículo dominante (Buratini, 2007). O folículo dominante atinge seu tamanho máximo e produção máxima de estrógeno durante o pró-estro (Sartori et al., 2017). Este estrógeno atua sobre o hipotálamo da fêmea resultando na alteração do seu comportamento fazendo com que ela entre em estro. Do mesmo modo o feedback positivo do estrógeno sobre o centro gerador de pulsos de GnRH faz com que um pico seja secretado, levando imediatamente a secreção de um pico de LH, que é responsável pela ovulação, que pode ocorrer aproximadamente em 28 horas (Sartori et al., 2017). Vale lembrar que o cio ocorre devido ao alto nível de estrógeno, produzido pelo folículo pré-ovulatório em seu maior tamanho, que atua no hipotálamo alterando o comportamento dessa fêmea. Da mesma maneira, faz um feedback positivo no centro gerador de pulso de GnRH induzindo ao seu pico e conseqüentemente ao pico de LH, responsável pela ovulação, que irá ocorrer em aproximadamente 28 horas (Sartori et al., 2017)

Quando a quantidade de estrógeno na circulação chega a determinado nível, ocorre a sensibilização das áreas superiores do sistema nervoso central, fazendo com que a fêmea manifeste sinais de aceitação do macho (estro). Atua também nos centros controladores da onda pré-ovulatória, provocando o efeito feedback positivo (Fortune et al., 2004), fazendo com que uma grande quantidade de GnRH seja liberada na circulação (Buratini, 2007).

Existem atualmente diversos protocolos de IATF com variações de hormônios, sendo

que os mais utilizados são aqueles à base de estrógenos e progestágenos para que ocorra a sincronização da onda folicular seguida do uso da prostaglandina no momento da remoção do progestágenos para permitir o término da fase luteínica de forma sincronizada e, após se realiza a indução da ovulação com o uso do GnRH ou análogos e os estrógenos e seus ésteres (Bó et al., 2003).

Quando se usa ésteres de estradiol, como é o caso do cipionato, se espera que ele, somado ao estrógeno que o folículo está produzindo, atuem no hipotálamo e iniciem essa cascata que culmina com a ovulação (Clarke; Pompolo, 2005). Nos animais que não apresentam cio, uma das hipóteses seria de que esse nível de estrógeno não foi suficiente e a ovulação pode não acontecer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Induzir a puberdade, avaliar a dinâmica folicular e perfil hormonal em novilhas Nelore e Murrah pré púberes, empregando o uso da biotecnologia de inseminação artificial em tempo fixo.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir a ciclicidades das novilhas;
- Avaliar o tamanho do folículo dominante na retirada do implante de progesterona;
- Avaliar o tamanho do folículo ovulatório no dia da inseminação;
- Avaliar horário e taxa de ovulação;
- Mensurar a dosagem dos hormônios Estrógeno e Progesterona, em novilhas Nelore pré púberes no D7, D9, e em novilhas Murrah pré púberes no D9, D12.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização

O experimento foi conduzido em propriedades situadas na zona rural do município de Mojuí dos Campos, no estado do Pará, Fazenda Santo Antônio (- 2.6771423649258606, - 54.62599458035762) e Jaraguá (-2.775883897611319, -54.43735813995761), nos meses de fevereiro a março de 2023.

4.2 Animais e alimentação

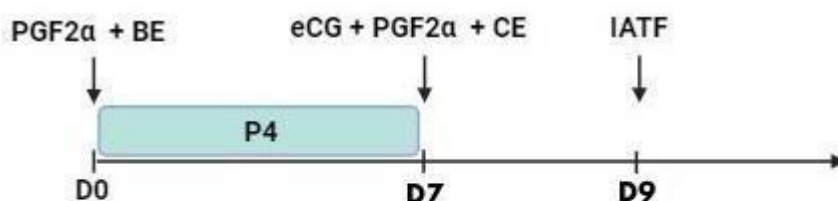
No presente estudo foram utilizadas 6 novilhas Nelore pré púberes com idade média de 14 a 17 meses, pesando 320 kg a 350 kg e 6 novilhas Murrah pré púberes com idade média de 14 a 17 meses, com peso entre 422kg a 523 kg, devidamente identificadas. As novilhas foram submetidas previamente a avaliações através de ultrassonografia para mensuração do tamanho dos ovários e espessura do útero para selecionar as pré-púberes. Para realização deste experimento as mesmas foram mantidas sob pastejo (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), suplementados com sal mineral e acesso à água *ad libitum*.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo N° 0520230262, da UFOPA.

4.3 Protocolo de IATF utilizados em novilhas Nelore pré-púberes

Todos os animais receberam o protocolo hormonal para sincronização da ovulação, no dia inicial do protocolo (D0) foi realizado a inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com 0,5mg de progesterona (DIB®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE) (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brasil) via intramuscular (IM) e 1,0mg de prostaglandina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No sétimo dia (D7) o implante foi removido e aplicados 0,5mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, São Paulo, Brasil), 2,5mg de prostaglandina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil), 300UI de eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) via IM. No nono dia (D9) às novilhas Nelore foram inseminadas no período da tarde, 48 a 56 horas após a retirada do dispositivo.

Figura 1 – Protocolo utilizado em novilhas Nelore pré-púberes

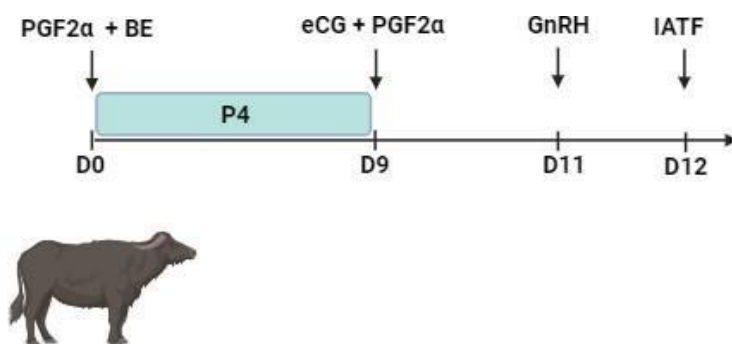


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.4 Protocolo de IATF utilizados em novilhas Murrah pré-púberes

Todos os animais receberam o protocolo hormonal para sincronização da ovulação, no dia inicial do protocolo (D0) foi realizado no período da tarde a inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com 0,5mg de progesterona (DIB®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE) (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brasil) via intramuscular (IM) e 1mg de prostaglandina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil), No nono dia (D9) pelo período da tarde o implante foi removido, e aplicado 2,5mg de prostaglandina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil), 400UI de eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) via IM. No décimo primeiro dia (D11) foram aplicados 2,5mg de GnRH (Tec-relin® - Tecnopec) às 16h. No décimo segundo dia (D12) as novilhas Murrah foram inseminadas no período da manhã, às 8h.

Figura 2 – Protocolo utilizado em novilhas Murrah pré-púberes



Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.5 Experimento 1- Dinâmica folicular em novilhas Nelore e Murrah pré púberes submetidas ao protocolo de IATF

Todas as novilhas, pré-púberes entraram em protocolo de IATF para avaliação do folículo dominante, folículo ovulatório e horário da ovulação. Para a avaliação da dinâmica folicular utilizou-se um aparelho de ultrassonografia transretal (US; Mindray, DP-50Vet, transdutor linear transretal 5MHz), os ovários foram escaneados e a imagem dos maiores folículos congeladas para determinação do diâmetro do folículo dominante.

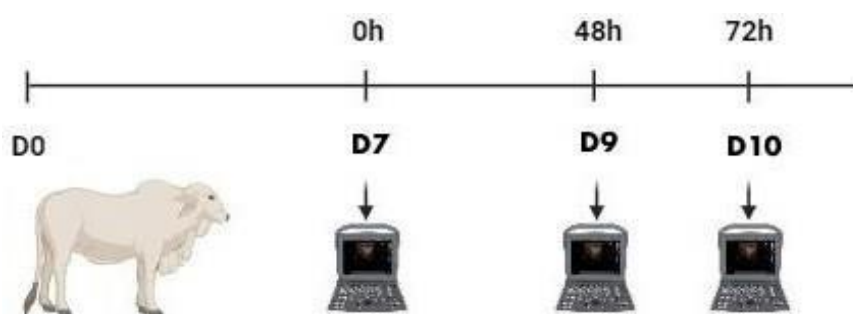
No D0 os ovários das novilhas Nelore foram escaneados e a imagem congelada para

mensurar o diâmetro dos ovários e a espessura do útero, ainda na avaliação das fêmeas foi verificado se havia ciclicidade. No D7, D9 e D10 os ovários foram localizados por ultrassonografia, e a imagem congelada para determinar o diâmetro do folículo dominante. A partir do décimo dia (D10) de protocolo das novilhas Nelore e décimo primeiro dia (D11) das novilhas Murrah ocorreu o acompanhamento através da ultrassonografia de 12 em 12 horas para determinar o horário que ocorreram as ovulações. O horário da ovulação foi estabelecido como a hora do exame, no qual ocorreu o desaparecimento do folículo ovulatório (ovulação), (Figura 3 a).

A dinâmica folicular de novilhas Murrah ocorreu nos dias D9, D11, D12 e D13 (para novilhas que não haviam ovulado). Após o dia da inseminação, D12, a avaliação ultrassonográfica foi realizada de 12 em 12 horas para determinar o horário da ovulação. As fêmeas ovuladas eram marcadas com bastão marcador e eram separadas das fêmeas que não haviam ovulado, essas seriam escaneadas novamente 12 horas após a última avaliação ultrassonográfica. Segundo Sales et al. (2012) as ovulações podem se dispersar em uma janela de 48 horas com amplitude de 48 horas até 96 horas utilizando tanto BE quanto ECP, seguindo essa premissa, 3 búfalas remanescentes passaram pelo escaneamento ultrassonográfico na manhã do D13 (Figura 3 b).

Figura 3 – Modelo esquemático da realização dos exames ultrassonográficos para verificar a dinâmica folicular, taxa de ovulação e o horário da ovulação em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes

(a)



(b)



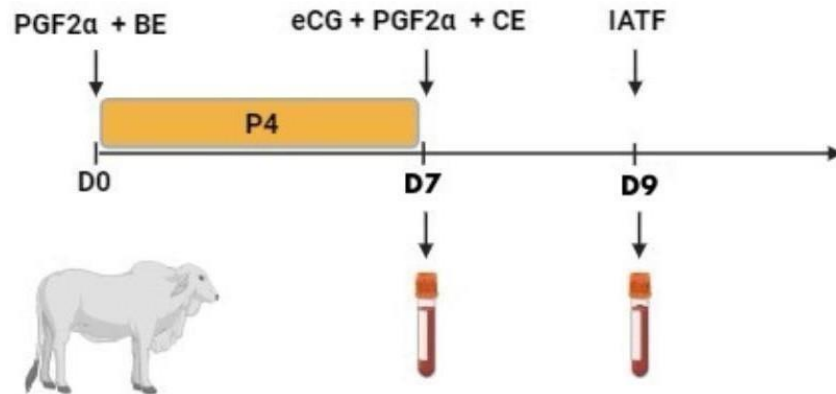
Fonte: Elaborado pela própria autora

4.6 Experimento 2- Dosagem dos hormônios progesterona (P4) e estradiol (E2) de novilhas Nelore e Murrah pré-púberes submetidas ao protocolo de IATF

Coletou-se amostras de sangue nos dias 8 e 10 do protocolo das fêmeas Nelore e nos dias 9 e 11 das fêmeas Murrah, pré-púberes protocoladas para IATF através da punção da veia jugular, usando agulhas e frascos com vacutainer sem anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram devidamente identificadas e imediatamente colocadas em uma bolsa térmica com gelo na posição vertical mantidas refrigeradas até serem entregues ao laboratório, as amostras passaram pelo processo de centrifugação para separação de hemácias, plasma e soro, foi retirado 0,5ml de soro, armazenado em microtubos de 1,5ml e enviados para o laboratório. Para a dosagem de Progesterona e Estradiol, a técnica que se utilizou foi a de quimioluminescência que consiste na mensuração hormonal pelo qual se obtém energia luminosa através de reações químicas.

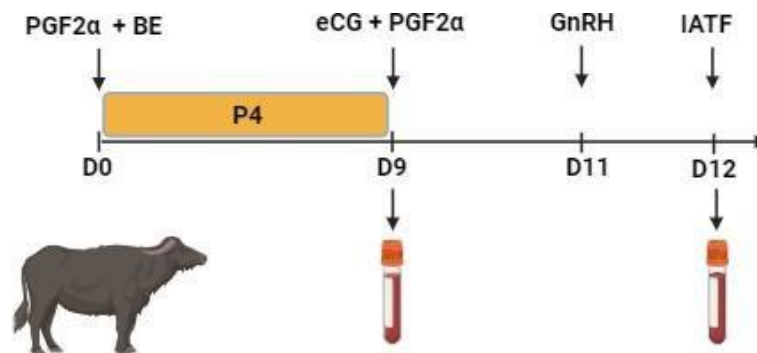
As amostras de P4 e E2 nos dias D7 e D9 foram utilizadas para avaliar a influência da concentração de P4 e E2 no diâmetro do folículo dominante e ovulatório das novilhas Nelore, (Figura 4) e nos dias D9 e D12 as amostras de P4 e E2 foram utilizadas para avaliar a influência da concentração de P4 e E2 no diâmetro do folículo dominante e ovulatório das novilhas Murrah, (Figura 5).

Figura 4 - Modelo esquemático da realização das coletas para verificar a dosagem hormonal em novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 5 - Modelo esquemático da realização das coletas para verificar a dosagem hormonal em novilhas Murrah pré-púberes

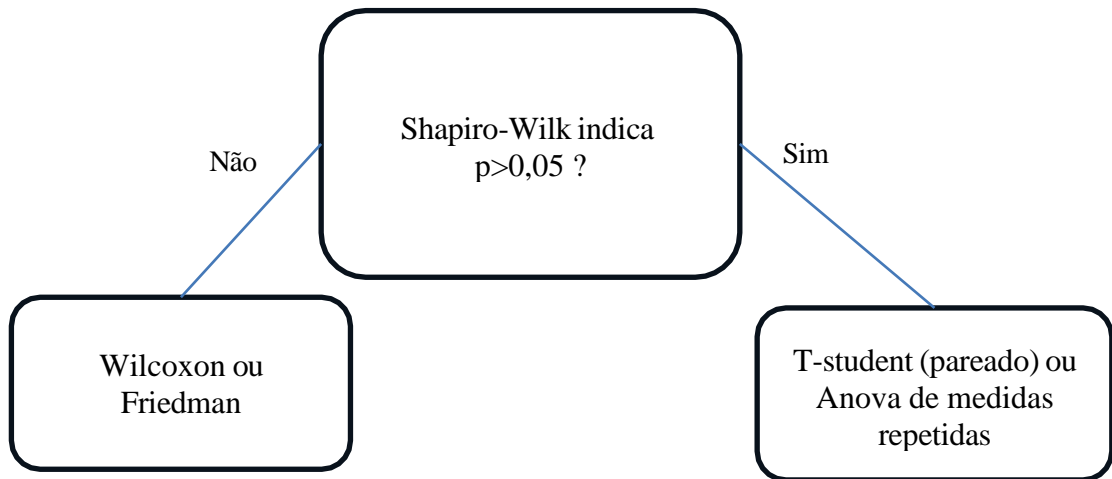


Fonte: Elaborado pela própria autora

4.7 Análise estatística

Este estudo avaliou os níveis hormonais e a dinâmica folicular em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes submetidas à IATF. Os dados foram organizados no Microsoft Excel e, posteriormente, analisados no RStudio. As estatísticas descritivas da dinâmica folicular, dos níveis de progesterona e estradiol foram calculadas. A dinâmica folicular foi avaliada ao longo do tempo e submetida a teste estatísticos para verificar a existência de diferenças entre as médias/mediana do diâmetro folicular, em cada etapa do experimento, entre as espécies. Para tanto, avaliou-se a normalidade das medidas (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Levene), conforme sugerido por Reiter et al. (2019). A escolha do teste a ser usado foi baseado no esquema indicado na Figura 6.

Figura 6 - Escolha do teste para comparação de médias ou mediana



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Assim, em caso de violação do pressuposto de normalidade, recorre-se a testes não paramétricos de Wilcoxon (comparações entre dois grupos) ou de Friedman (comparações entre mais de dois grupos). Os níveis hormonais também foram comparados entre as espécies. Por fim, uma regressão linear e polinomial foi empregada para investigar a relação entre os níveis de progesterona e estradiol em cada espécie.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dinâmica Folicular

Médias e respectivos desvios padrão para o diâmetro do folículo dominante na retirada de implante de P4 e diâmetro do folículo ovulatório (DFOL) em novilhas Nelore e Murrah são exibidos na Tabela 1. A Tabela 1 apresenta, ainda, taxa de ovulação para cada espécie, com destaque para nelore, com 100% de ovulação.

Tabela 1 - Dinâmica folicular e taxa de ovulação dos animais pré-púberes.

PARÂMETROS	NELORE	MURRAH
Diâmetro do folículo dominante na retirada de implante de P4	6,5±1,59mm ^a	6,9±4,97mm ^a
Diâmetro do folículo ovulatório (DFOL)	7,83±2,25mm ^a	7,7±1,63mm ^a
Taxa de ovulação (%)	100% (6/6)	50% (3/6)

Médias seguidas pela mesma letra não variaram estatisticamente ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A Tabela 1 apresenta os diâmetros médios do folículo dominante (DFD) (na retirada do implante de progesterona (P4)): 6,5 ± 1,59 mm (Nelore) e 6,9 ± 4,97 mm (Murrah), e do folículo ovulatório (DFOL): 7,83 ± 2,25 mm (Nelore) e 7,7 ± 1,63 mm (Murrah). Esses valores são compatíveis com o diâmetro médio do DFD de 6 a 7 mm relatado por Vrisman et al. (2017) em novilhas pré-púberes submetidas a protocolos de indução da ovulação com GnRH, e também com os 6,6 ± 1,0 mm observados por Silva (2015) em estudo similar. A concordância com os dados de Guimarães et al. (2022), que descrevem dinâmica folicular semelhante em novilhas pré-púberes e adultas após protocolos hormonais, e com os valores de 6,4 mm e 6,7 mm, respectivamente, relatados por Lemes (2017) em animais tratados com progesterona (dispositivos intravaginais e injetável), reforça a eficácia desses protocolos em promover crescimento folicular adequado para a ovulação.

A comparação entre os diâmetros do folículo dominante (DFD) e do folículo ovulatório (DFOL) em Nelore, avaliada nos dias 7 (D7) e 9 (D9), revelou normalidade (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (Levene, $p > 0,05$), permitindo o uso do teste t pareado.

Embora tenha sido observado um aumento numérico no diâmetro folicular de D7 para D9 (média da diferença = 1,33 mm), este não foi estatisticamente significativo ($t(5) = 2,35$; $p = 0,065$), possivelmente devido ao tamanho amostral limitado ($N=6$). Consequentemente, não se constatou aumento estatisticamente significativo do DFOL em relação ao DFD.

Por outro lado, a análise da dinâmica folicular em Murrah indica uma violação do pressuposto de normalidade em D9 ($W = 0,700$, $p = 0,006$), ao contrário de D11 ($W = 0,867$, $p = 0,257$). Esta diferença na distribuição dos dados levou à aplicação do teste de Wilcoxon rank-sum com correção de continuidade para comparar D9 e D11. Os resultados, similarmente ao observado em Nelore, não indicaram diferença estatisticamente significativa na dinâmica folicular entre os dias ($W = 9$, $p = 0,304$). Este padrão de resposta folicular, caracterizado pela ausência de diferença significativa entre os diâmetros foliculares em diferentes momentos, é corroborado pela literatura.

Por exemplo, Rautela et al. (2024) reportaram diâmetro folicular e dominante médio de aproximadamente 7 mm em búfalas Murrah no momento da retirada do implante de progesterona, valor similar ao encontrado neste estudo, sugerindo consistência na resposta folicular de búfalas Murrah a protocolos hormonais. Esta constatação se alinha aos achados de Baruselli et al. (2004) e Bartolomeu et al. (2010), que também observaram respostas foliculares semelhantes em protocolos de sincronização para bovinos e bubalinos.

Quanto ao diâmetro do folículo ovulatório (DFOL), os valores observados foram de $7,83 \pm 2,25$ mm em Nelore e $7,7 \pm 1,63$ mm em Murrah. Esses resultados corroboram os achados de Baruselli et al. (2022), que destacam diâmetros foliculares superiores a 7 mm como preditores de ovulação bem-sucedida em novilhas submetidas a protocolos de IATF. Além disso, Guimarães et al. (2022) enfatizaram que o uso de progestágenos e estradiol em protocolos hormonais estimula a maturação folicular em novilhas pré-púberes, permitindo que estas alcancem diâmetros compatíveis com a ovulação, especialmente em condições de manejo controlado.

O diâmetro médio do folículo ovulatório (DFOL) encontrado foi de $7,83 \pm 2,25$ mm em Nelore e $7,7 \pm 1,63$ mm em Murrah. Esses valores corroboram os achados de Rautela et al. (2024), que ressaltaram que o desempenho reprodutivo das búfalas Murrah pode ser otimizado por meio de protocolos hormonais bem ajustados. Contudo, os autores indicaram que a resposta folicular em búfalas frequentemente apresenta maior variação quando comparada a bovinas zebrúinas, devido à sensibilidade dessas fêmeas a fatores como estresse térmico e manejo nutricional.

Os valores de DFOL no presente estudo estão alinhados com a pesquisa de Gimenes et al. (2008) e Dias et al. (2009) que também indicam que a capacidade ovulatória do folículo é adquirida a partir de 7 mm, o que está em conformidade com os dados encontrados para Murrah e Nelore, corroborando com dados de Lemes (2017) no momento da IATF de (7,9 mm e 8,1 mm). Isso reforça que os protocolos utilizados em ambos os estudos promoveram a maturação folicular até valores compatíveis com a ovulação, demonstrando eficiência dos tratamentos. Essa faixa sugere que os folículos do estudo estavam dentro do limite funcional para ovulação.

Em ambos os grupos, a utilização de progesterona e estradiol foi eficaz para promover a maturação folicular, sem diferenças no tamanho do folículo ovulatório entre as espécies, reforçando a aplicabilidade dos protocolos em Nelore e Murrah. O menor folículo apresentado no presente estudo foi de 4,8 mm e o maior, de 11,1 mm, resultados que estão em concordância com o estudo de Viana et al., (2012), o qual descreve variações semelhantes em novilhas pré-púberes, com diâmetros entre 5,0 mm e 13,0 mm.

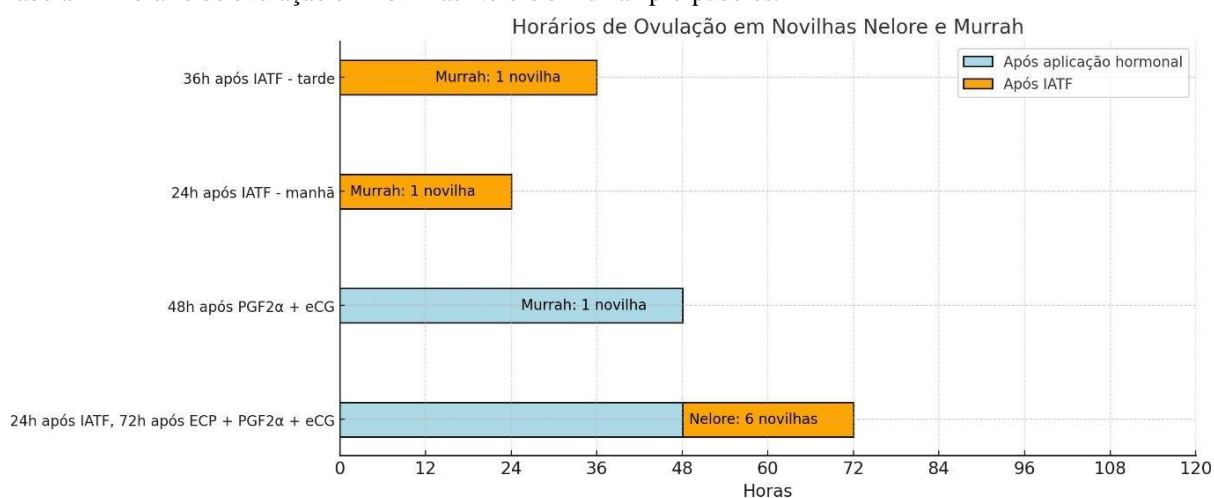
Além disso, estudos corroboram a eficácia da CE em promover a ovulação de forma consistente. No presente estudo, todas as novilhas Nelore ovularam no mesmo dia, 24h após a inseminação e 72 horas após a aplicação de CE + PGF2 α + eCG e a retirada do implante de progesterona, com uma taxa de ovulação de 100%. Dentre as novilhas Murrah, do total de 6 animais apenas 3 ovularam, sendo uma no dia da inseminação (D11), 48h após injeção de PGF2 α + eCG, e as outras duas no dia seguinte (D12) uma pela parte da manhã e a outra pela parte da tarde, 24h e 36h após a inseminação, respectivamente.

A não ovulação pode estar associada a uma série de fatores. Estudos mais recentes, como os de Nogueira et al., (2021), sugerem que a insuficiente liberação do hormônio luteinizante (LH) pode ser um dos principais motivos para a falha ovulatória em protocolos de sincronização, especialmente em búfalas. Outro fator relevante é o manejo dos animais. No estudo de Rodrigues et al., (2020) é destacado que búfalas criadas em sistemas extensivos tendem a ser mais sensíveis ao estresse, o que pode impactar negativamente o eixo reprodutivo, resultando em menor liberação de LH e uma resposta ovulatória menos eficiente.

A taxa de ovulação observada em Nelore (100%) e Murrah (50%) sugere diferenças na eficiência reprodutiva entre as espécies. Baruselli et al., (2022) destacam que, em novilhas Nelore, os protocolos de IATF apresentam taxas de ovulação que variam de 90% a 100%, consistente com o que foi observado no presente estudo. Estudo de Rautela et al., (2024) em búfalas Murrah relatou taxas de ovulação em torno de 50%, também alinhadas aos resultados da presente pesquisa, tendo em vista que a sazonalidade e a variação hormonal afetam significativamente a resposta reprodutiva em Murrah.

Embora as búfalas e zebuínas apresentem características fisiológicas e morfométricas diferentes, estudos recentes, como o de Mendes et al., (2022), sugerem que ambas as espécies podem alcançar altos níveis de desempenho reprodutivo quando são submetidas a condições ideais de manejo e nutrição. Sendo assim, a adaptação dos protocolos hormonais às especificidades de cada espécie, somada a um manejo adequado, se faz fundamental para maximizar o desempenho reprodutivo em ambos os grupos, conforme destacado por Souza et al. (2021) e Leal (2020).

Tabela 2 - Horário de ovulação em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

No presente estudo os horários de ovulação foram definidos como a hora do exame de ultrassonografia, que o folículo ovulatório desapareceu ao exame. O presente estudo avaliou a resposta ovulatória de novilhas Nelore e Murrah submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) baseado na aplicação de ECP, PGF2α e eCG. Os resultados obtidos indicaram diferenças entre as espécies em relação à dinâmica ovulatória, o que reforça a importância de considerar as particularidades fisiológicas de cada grupo ao adotar estratégias reprodutivas.

Todas as novilhas Nelore ovularam no mesmo dia, 24h após a inseminação e 72h após aplicação de ECP + PGF2α + eCG e retirada do implante de progesterona, tendo taxa de ovulação de 100%. A adição de PGF2α no momento do implante do dispositivo intravaginal de P4 resultou em DFOL de 10,3±0,06 mm e taxa de ovulação de 72,7% (Sá Filho et al. 2005a). Resultados parecidos de taxa de ovulação (94,4%) também foram atingidos por Sá Filho et al. (2005b) ao administrar eCG no momento da retirada de implante.

Os resultados do presente estudo indicaram que as novilhas Nelore ovularam predominantemente até 72 horas após a aplicação de ECP + PGF2 α + eCG, com todas apresentando ovulação em até 24 horas após a IATF. Este intervalo sugere alta sincronização da dinâmica folicular e resposta eficiente ao protocolo hormonal, condizente com estudos que destacam a eficácia de protocolos baseados em progesterona e eCG em bovinos zebuínos. Por exemplo, Baruselli et al. (2012) discutem a evolução e as perspectivas dos programas de inseminação artificial em tempo fixo no Brasil, enfatizando a eficácia desses protocolos em bovinos. Esses resultados também corroboram com os estudos de Sousa (2017) que destaca a alta eficiência do protocolo na sincronização da ovulação em zebuínos e evidenciou que protocolos hormonais são eficazes na indução da puberdade. Rodrigues (2012), relatou que o uso de gonadotrofinas (eCG) em protocolos de sincronização aumentou a taxa de prenhez em **20%** quando comparado aos protocolos sem eCG, destacando o papel do eCG na estimulação do desenvolvimento folicular e da ovulação em bovinos zebuínos.

Dentre as novilhas Murrah, do total de seis animais avaliados, apenas três ovularam. Destas, uma ovulou no dia da inseminação (D11), 48 horas após a injeção de PGF2 α + eCG, enquanto as outras duas ovularam no dia seguinte (D12), sendo uma pela manhã, 24 horas após a IATF, e outra pela tarde, 36 horas após a inseminação. Segundo Sales et al. (2012), as ovulações em bubalinos podem ocorrer dentro de uma janela de 48 horas, com amplitude que varia entre 48 e 96 horas, o que explica a dispersão observada neste estudo. A resposta ovulatória mais heterogênea entre as Murrah pode ser atribuída às características fisiológicas específicas da espécie, como a dinâmica folicular menos previsível e o metabolismo hormonal mais lento, conforme destacado por Rodrigues (2012).

A ovulação da maioria das novilhas Nelore ocorreu quando o folículo atingiu >7,6mm, duas novilhas apresentavam diâmetros 7,6mm. As 3 búfalas que não ovularam continuaram apresentando crescimento no folículo pré-ovulatório de 0,25 \pm 0,2mm no D13 (9,43 \pm 0,75mm), a não ovulação pode estar relacionada a vários fatores, como liberação insuficiente de LH (Day; Anderson, 1998), baixa concentração de IGF-1 e outros fatores de crescimento (Melo et al., 2005), manejo, e temperamento, pois quando criadas em sistema extensivo, as novilhas tendem a ser mais agitadas (Fujita, et al., 2013).

O intervalo crítico entre 48 e 72 horas após a aplicação hormonal foi identificado como essencial para o sucesso da ovulação sincronizada em Nelore. Rodrigues (2012) reforça que protocolos com tempos bem definidos para retirada do implante e aplicação de eCG aumentam a previsibilidade da ovulação, otimizando os resultados reprodutivos. Por outro lado, os dados

de Murrah sugerem a necessidade de ajustes no protocolo hormonal, como a modulação da dose de eCG ou alterações no tempo de exposição ao dispositivo de progesterona, para alcançar maior precisão na sincronização ovulatória.

5.2 Perfil de progesterona e estrógeno

Os valores de P4 e E2 observados na primeira coleta, no D7 para Nelore e D9 para Murrah, refletem o período de transição entre a fase folicular e a fase luteal. Neste estudo os resultados estão descritos, na primeira coleta de progesterona, realizada em Nelore e Murrah, apresentou níveis de P4 mais baixos, condizentes com o estágio inicial de formação do corpo lúteo, conforme descrito por Sales et al., (2012) e corroborado por Vasconcelos et al., (2009). Na segunda coleta, realizada observamos um aumento nos níveis de P4, o que sugere a presença de um corpo lúteo funcional. Esse aumento é consistente com estudos que apontam o corpo lúteo como responsável por manter os níveis de progesterona necessários para sustentar o início da gestação após uma IATF, promovendo uma taxa de concepção otimizada (Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2010).

Estudos mais recentes sobre dinâmica folicular, como o de Baruselli et al., (2021), indicam que a segunda coleta D10 em Nelore geralmente reflete o aumento da atividade luteal, justificando o aumento de P4 (1,00 ng/mL em Nelore), associado à plena formação do corpo lúteo. O aumento discreto de E2, observado no D10, pode estar relacionado à emergência de uma nova onda folicular, o que está em conformidade com estudos que analisam a interação entre os picos de E2 e P4 durante o ciclo estral em bovinos e bubalinos (Baruselli et al., 2021; Neves, 2010).

As Tabelas 3 e 4 apresentam as médias das concentrações hormonais de progesterona (P4) e estrogênio (E2) em novilhas das raças Nelore e Murrah ao longo do protocolo de indução. Os Gráficos das Figuras 8 e 9 sintetizam os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4. Esses dados permitem uma análise comparativa detalhada das respostas hormonais entre as duas raças, destacando variações no perfil endócrino durante o tratamento.

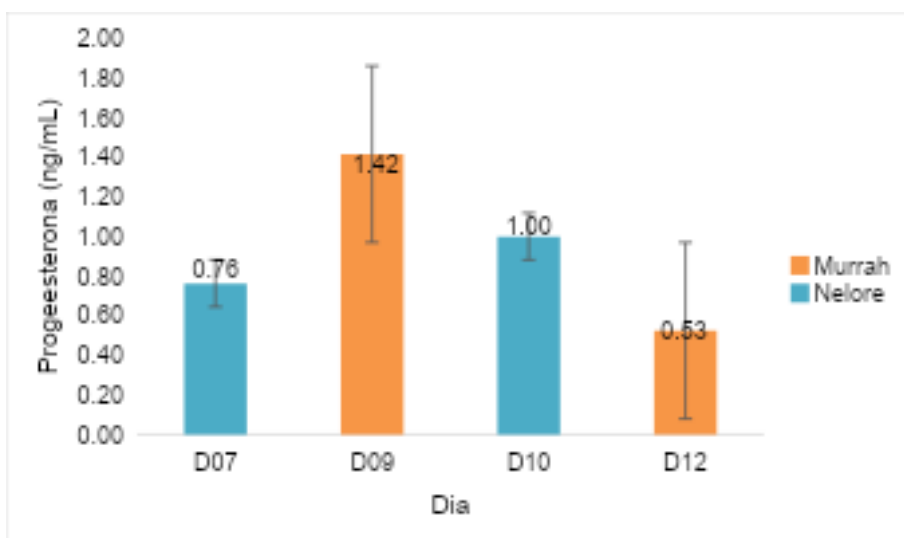
Tabela 3 - Dosagem hormonal (média e desvio padrão) de progesterona em novilhas pré-púberes Nelore e Murrah no D7, D9, D10, D12

DIA	HORMÔNIO	NELORE	DIA	HORMÔNIO	MURRAH
D7	P4	0,76± 0,32ng /mL	D9	P4	1,42±1,56 ng/mL
D10	P4	1,00 ±0,61 ng/mL	D12	P4	0,52± 0,31ng/mL

Fonte: Elaborado pela própria autora.

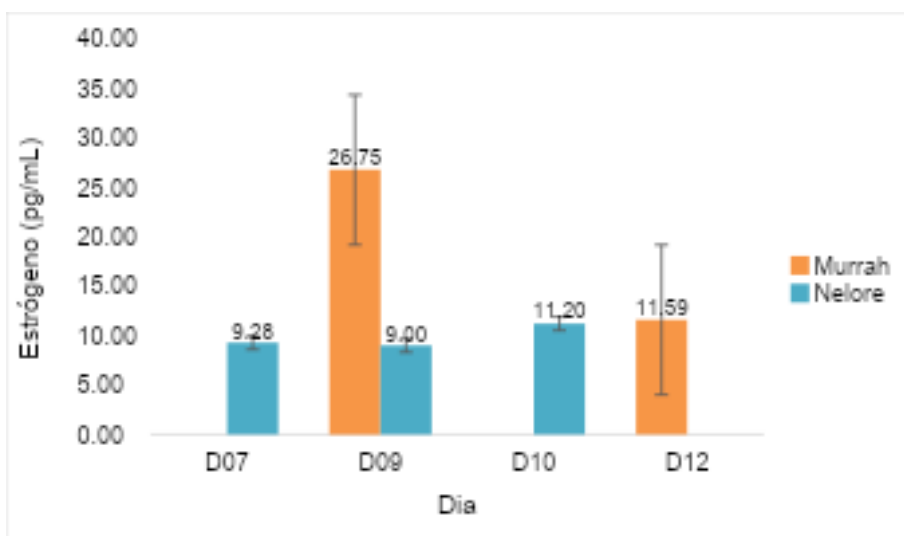
Os níveis de progesterona em novilhas Nelore e Murrah mostrou normalidade apenas no grupo Nelore ($W = 0,892$, $p = 0,328$), enquanto o grupo Murrah apresentou violação significativa deste pressuposto ($W = 0,601$, $p = 0,000$). Apesar da diferença na distribuição dos dados, o teste de Wilcoxon para amostras independentes não indicou diferença estatisticamente significativa nos níveis de progesterona entre as raças ($W = 34,5$, $p = 0,664$).

Figura 8 - Dosagem de progesterona no protocolo de IATF em Nelore e Murrah



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 9 - Dosagem de Estradiol no protocolo de IATF em Nelore e Murrah.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os resultados obtidos no presente estudo, com concentrações médias de progesterona (P4) nas novilhas Nelore de $0,76 \pm 0,32$ ng/mL no D7 e $1,00 \pm 0,61$ ng/mL no D10, e nas novilhas Murrah de $1,42 \pm 1,56$ ng/mL no D9 e $0,52 \pm 0,31$ ng/mL no D12, refletem variações

esperadas durante o protocolo de sincronização e são consistentes com a literatura existente.

A literatura aponta que as concentrações de P4 superiores a 1 ng/mL no período lúteo são essenciais para sustentar a função do CL e garantir taxas satisfatórias de concepção (Cavalieri e Fitzpatrick, 1995; Binelli et al., 2001). Os valores observados no presente estudo, embora dentro das faixas relatadas, mostram que a variabilidade na resposta individual, especialmente em Murrah, pode impactar qualidades nas taxas de concepção, como sugerido por Mantovani et al. (2002).

Por outro lado, a redução de P4 em Murrah no D12, comparada ao D9, também está alinhada aos achados de Geary et al. (1998), que observaram declínios na P4 associados ao início da luteólise em resposta à administração de PGF2 α . Isso sugere que o protocolo usado foi eficiente para induzir as respostas esperadas nos ciclos hormonais, embora as variabilidades observadas entre espécies possam ser atribuídas a diferenças intrínsecas na dinâmica hormonal entre bovinos e bubalinos.

Os estudos de Taponen et al. (1999) destacam que a aplicação de GnRH promove um pico antecipado de LH, interrompendo o desenvolvimento folicular de folículos dominantes em estágios subóticos, o que pode levar à formação de CL com função reduzida e menor produção de P4. Esse mecanismo pode explicar a menor concentração média de P4 observada em algumas das novidades Murrah.

Esses dados reforçam que, embora os protocolos sejam eficazes em geral, as diferenças entre as espécies e a condição física dos animais são fatores determinantes na eficácia do tratamento. Portanto, os resultados do seu estudo estão bem embasados e corroboram a literatura disponível, oferecendo contribuições importantes para o entendimento da dinâmica hormonal em protocolos de IATF em novidades pré-púberes.

A redução significativa de P4 em Murrah no D12 ($0,52 \pm 0,31$ ng/mL) reflete a luteólise causada por PGF2 α , conforme relatado por Berber et al. (2007). Esses autores destacam que, após a aplicação de PGF2 α , os níveis de P4 caem para valores abaixo de 1 ng/mL, destacando a eficiência do protocolo na indução da regressão do CL.

Em Nelore, o aumento de P4 entre D7 e D10 indica a funcionalidade do CL recém-formado. Conforme Telles et al. (2012), a produção de P4 nesse estágio é essencial para preparar o útero para uma possível concepção, reforçando que os níveis observados no presente estudo seguem a curva esperada de elevação no início da fase lútea.

Tabela 4 - Dosagem hormonal (Média e desvio padrão) de estrógeno em novilhas pré-púberes Nelore e Murrah no D7, D9, D10, D12

DIA	HORMÔNIO	NELORE	DIA	HORMÔNIO	MURRAH
D7	E2	9,28± 0,69pg/MI	D9	E2	26,75± 41,13pg/mL
D10	E2	11,20±2,30 pg/mL	D12	E2	11,59± 6,35pg/mL

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A avaliação dos níveis de estradiol (E2) em novilhas Nelore e Murrah revelou violação significativa da normalidade em ambos os grupos (Nelore: $W = 0,496$, $p = 0,000$; Murrah: $W = 0,389$, $p = 0,000$). Utilizando o teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes, considerando a não normalidade dos dados, também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as raças ($W = 28$, $p = 0,811$).

A diferença na resposta entre Nelore e Murrah é evidente, com as novilhas Murrah apresentando uma concentração de progesterona visualmente mais alta, especialmente no D9 (1,42 ng/mL), em comparação com Nelore no D10 (1,00 ng/mL). Essa diferença pode ser atribuída à adição de eCG no protocolo, conforme discutido na literatura de Maggitti (2019), onde a utilização de eCG foi associada a uma resposta lútea mais robusta em bubalinas, favorecendo o desenvolvimento do corpo lúteo (CL) e a produção de progesterona.

Na literatura, como reportado por Baruselli et al., (1997), os níveis elevados de E2 em bubalinos estão associados à proximidade da ovulação, indicando a fase de crescimento final dos folículos dominantes. A resposta exagerada de E2 nas Murrah pode ser explicada por um maior número de ondas foliculares, característica comum em bubalinos, que frequentemente apresentam até três ondas por ciclo estral. Além disso, o estradiol desempenha um papel crucial na preparação do ambiente uterino para a implantação embrionária, complementando a função da progesterona.

Segundo Baruselli et al. (2003), os níveis de E2 atingem seu pico próximo ao momento da ovulação devido ao aumento da ordenação do folículo dominante. No presente estudo, os valores mais elevados de E2 foram observados no D9 em Murrah ($26,75 \pm 41,13$ pg/mL), o que é consistente com os relatos de Barros et al. (2000), que descreveram maiores concentrações de E2 nas fases mais próximas à ovulação em protocolos que utilizam GnRH e PGF2 α . Sousa (2017) destacou que as concentrações de E2 em novilhas Nelore pré-púberes aumentam progressivamente durante a fase de crescimento folicular, atingindo picos antes da ovulação. Os valores obtidos no presente estudo para Nelore (D7: $9,28 \pm 0,69$ pg/mL; D10: $11,20 \pm 2,30$ pg/mL) corroboram os resultados de Sousa, que relatam aumentos semelhantes

em protocolos envolvendo dispositivos intravaginais de progesterona e aspiração folicular.

Estudos como o de Porto-Filho (2000) e Kumar et al. (1991) destacam que as búfalas frequentemente apresentam maior variabilidade nos níveis hormonais devido às suas características fisiológicas únicas. O desvio padrão elevado no D9 em Murrah ($41,13 \text{ pg/mL}$) reflete essa variabilidade, conforme observado em outros estudos sobre sincronização de ovulação em bubalinos. A redução de E2 em Murrah do D9 ($26,75 \pm 41,13 \text{ pg/mL}$) para o D12 ($11,59 \pm 6,35 \text{ pg/mL}$) segue o padrão esperado após a luteólise e início do desenvolvimento de um novo CL, como descrito por Taponen et al. (1999). Essa redução é essencial para permitir o aumento da P4 e preparar o útero para a concepção. Sousa (2017) enfatizaram que as búfalas apresentam maior variabilidade hormonal em comparação aos bovinos. Isso se reflete nos níveis de E2 oferecidos no D9 ($26,75 \pm 41,13 \text{ pg/mL}$), que são significativamente mais altos e apresentam maior desvio padrão do que no Nelore. Essa variação pode ser atribuída a diferenças na sensibilidade hormonal entre as espécies, conforme indicado por Baruselli et al. (2007), que observaram maior sensibilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário em bubalinos.

Os valores mais obtidos de E2 em Nelore ao longo do protocolo (D7: $9,28 \pm 0,69 \text{ pg/mL}$; D10: $11,20 \pm 2,30 \text{ pg/mL}$) estão alinhados com os achados de Baruselli et al. (2003), que relata menor variabilidade nos níveis hormonais em bovinos zebuínos em comparação com taurinos ou bubalinos. Isso reflete menor sensibilidade de Nelore às mudanças hormonais externas causadas pelo protocolo. Estudos como os de Sousa (2017) confirmam que as respostas hormonais variam entre zebuínos e bubalinos devido a diferenças no metabolismo hormonal. Isso é evidenciado pelos níveis mais elevados e variáveis de E2 em Murrah em comparação com Nelore, que apresentaram valores mais resultados e homogêneos.

Ao comparar os dados obtidos neste estudo com os de pesquisas anteriores, observa-se uma tendência semelhante em relação à dinâmica hormonal. Vasconcelos et al., (2009) verificaram que o uso de protocolos de IATF à base de P4 e E2 é eficaz tanto para sincronizar a ovulação quanto para aumentar as taxas de prenhez. Baruselli et al., (2003) destacam a relevância do controle folicular por meio de tratamentos hormonais com P4 e E2, enfatizando que a sincronização precisa da ovulação permite uma melhor taxa de concepção em protocolos de IATF. Esses dados reforçam a importância de manter níveis adequados de estradiol e progesterona para melhorar os resultados reprodutivos.

Portanto os resultados desta pesquisa são consistentes com os achados descritos na literatura, demonstrando que o manejo adequado dos níveis hormonais de progesterona e estradiol é fundamental para o sucesso de programas de reprodução assistida em novilhas

Nelore e Murrah. As diferenças observadas entre as espécies, especialmente em relação aos níveis de estradiol, refletem variações na dinâmica folicular que podem ser exploradas para melhorar os resultados reprodutivos em ambas as raças.

Os resultados dos níveis de progesterona e estradiol entre novilhas bovinas e bubalinas apresentam padrões hormonais distintos entre as espécies, implicando diretamente na dinâmica folicular e no sucesso dos protocolos de IATF. Baruselli et al. (2004) demonstram que o protocolo da IATF pode criar um ambiente hormonal controlado, onde os níveis de estradiol aumentam de forma independente dos níveis de progesterona, em resposta à sincronização causada. A independência hormonal observada em nossos gráficos, evidenciada pela falta de uma relação linear entre progesterona e estradiol, sugere que o protocolo induz respostas hormonais específicas que minimizam a interdependência entre esses hormônios.

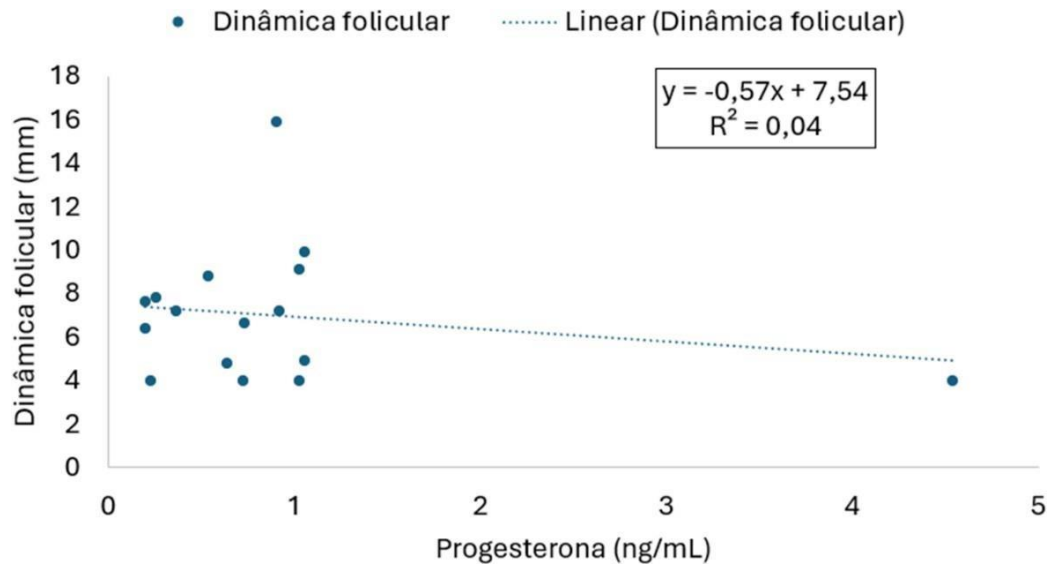
Os níveis hormonais, de progesterona e estradiol, estão diretamente ligados à dinâmica folicular, sendo confirmado por diversos estudos. De acordo com Fortune et al., (2001), a progressão do crescimento folicular em bovinos está diretamente associada à produção de estradiol, que aumenta à medida que o folículo dominante se desenvolve. Essa associação foi observada no presente estudo, onde houve uma relação positiva entre os níveis de progesterona e estradiol com o diâmetro folicular, embora o coeficiente (0,07) indique que esse efeito é moderado.

A precisão dos resultados obtidos no presente estudo pode ser atribuída ao uso de técnicas como radioimunoensaio (RIE) e quimioluminescência. De acordo com Lopes et al. (2015), esses métodos são amplamente aceitos e confiáveis para a avaliação de hormônios em ruminantes, desde que devidamente validados para as espécies avaliadas.

5.3 Progesterona, estrógeno e dinâmica folicular

Os níveis hormonais são fundamentais para a maturação e seleção folicular, impactando diretamente no diâmetro folicular podendo ser influenciado por uma série de fatores individuais e ambientais, o que justifica o efeito moderado identificado na análise de regressão da presente pesquisa, como apresentado das Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Regressão linear dos níveis de Progesterona e dinâmica folicular em Nelore (N=6) e Murrah (N=6)

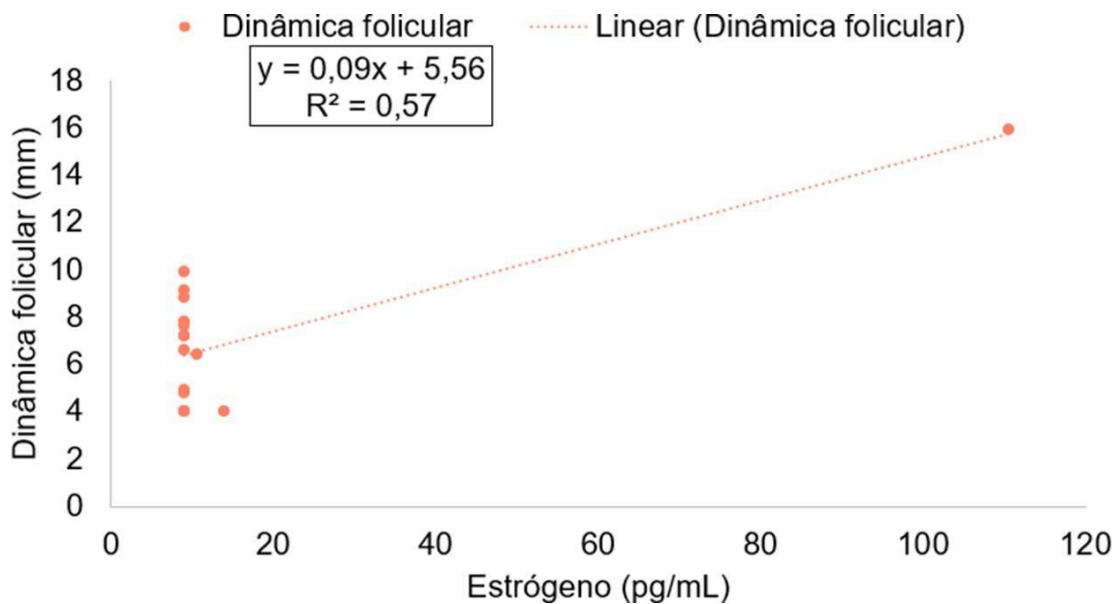


Fonte: Elaborado pela própria autora.

O gráfico da Figura 10 ilustra uma correlação negativa fraca entre os níveis de progesterona (ng/mL) e a dinâmica folicular (mm), com um R^2 de 0,04. No presente experimento, houve uma tendência de diminuição na dinâmica folicular com o aumento dos níveis de progesterona, porém essa relação é praticamente nula. A baixa correção indica presença de fatores além da concentração de progesterona no desenvolvimento folicular.

Por outro lado, os níveis de estrógeno (pg/mL) e a dinâmica folicular (mm) possuem correlação positiva moderada ($R^2 = 0,57$), indicando que o aumento nos níveis de estrógeno está associado a um aumento na dinâmica folicular, sugerindo um papel importante do estrógeno na estimulação do crescimento folicular, conforme ilustrado na Figura 11. Apesar da moderada força da correlação, a variabilidade observada nos dados indica a influência de outros fatores no desenvolvimento folicular, além dos níveis de estrógeno.

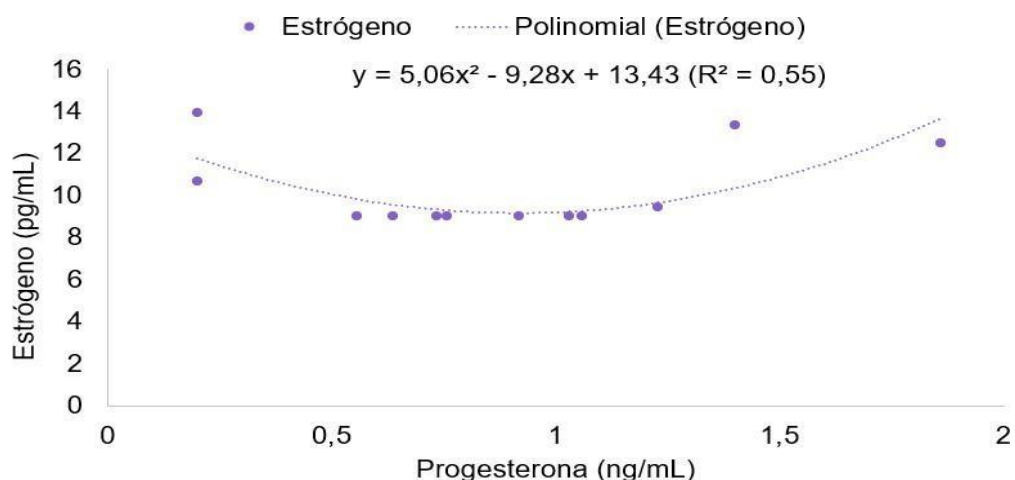
Figura 11 - Regressão linear dos níveis de Estrógeno e dinâmica folicular em Nelore (N=6) e Murrah (N=6)



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Para ampliar o estudo, a Figura 12 mostra como estrógeno e progesterona estão relacionados no experimento envolvendo as novilhas Nelore. A regressão polinomial de 2º grau descreve de modo marginal a relação entre estrógeno e progesterona em Nelore (N=6), com amostras coletadas no D7 e D10. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,55 indica que o modelo explica 55% da variabilidade nos níveis de estrógeno em função da progesterona. No experimento, houve aumento inicial de estrógeno com níveis crescentes de progesterona, seguido por uma estabilização e posterior aumento. Ressalta-se o tamanho amostral reduzido (N=6), o que limita a generalização dos resultados.

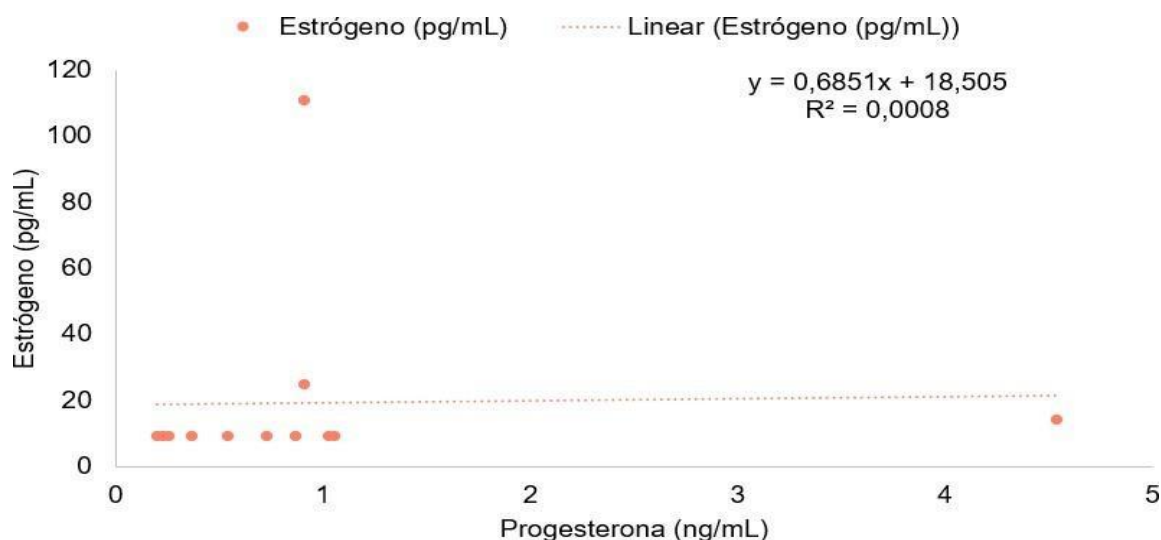
Figura 12 - Regressão polinomial dos níveis de Estrógeno e Progesterona em Nelore (N=6)



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A relação entre os níveis de progesterona (ng/mL) e estrógeno (pg/mL) em búfalas Murrah (N=6) é apresentada na Figura 13. A análise de regressão linear apresentou um baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,0008$), indicando uma correlação extremamente fraca entre as duas variáveis. Os dados sugerem que, no grupo estudado, não existe associação significativa entre as concentrações de progesterona e estrógeno, indicando que a variação nos níveis de um hormônio não explica a variação nos níveis do outro. Esta ausência de correlação pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a pequena amostragem e a complexidade do sistema hormonal envolvido na regulação do ciclo reprodutivo em búfalas.

Figura 13 - Regressão polinomial dos níveis de Estrógeno e Progesterona Murrah (N=6)



Fonte: Elaborado pela própria autora.

6 CONCLUSÕES

O uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) demonstrou ser uma ferramenta eficaz na indução da puberdade e no controle da dinâmica folicular em novilhas Nelore e Murrah pré-púberes. O protocolo utilizado promoveu o desenvolvimento folicular uniforme, evidenciado pela ausência de diferenças significativas no diâmetro dos folículos entre as raças, demonstrando sua capacidade de estimular a atividade cíclica ovariana de forma consistente.

A análise dos perfis hormonais revelou diferenças nos níveis de progesterona e estradiol entre Nelore e Murrah, refletindo particularidades fisiológicas específicas de cada espécie. Esses resultados destacam a necessidade de protocolos reprodutivos personalizados, capazes de atender às demandas biológicas de diferentes raças, e reforçam a relevância da adaptação de estratégias para maximizar a eficiência da IATF.

Os resultados desta pesquisa não atingiram apenas os objetivos propostos, mas também evidenciaram o papel essencial da biotecnologia reprodutiva na melhoria da produtividade e sustentabilidade da pecuária. Assim, este trabalho contribui para o entendimento das particularidades reprodutivas de bovinos e bubalinos, fornecendo uma base científica sólida para o aprimoramento de estratégias de manejo reprodutivo e para a promoção de sistemas pecuários mais eficientes e sustentáveis.

REFERÊNCIAS

ABCZ. **Nelore/ Nelore Mocho**. Uberaba, 2019. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/a-abcz/racas-zebuinas/raca/8/nelore---nelore-mocho>. Acesso em: 05 setembro 2023.

ADEPARA. **Estado do Pará detém o maior rebanho de búfalos do Brasil e o 2º maior rebanho bovino**. Disponível em: <https://agenciapara.com.br/noticia/40823/estado-do-para-detem-o-maior-rebanho-de-bufalos-do-brasil-e-o-2-maior-rebanho-bovino>. Acesso em: 10 novembro 2024.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef Report 2024. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2024-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>. Acesso em: 07 novembro 2024.

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. **Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans**. Theriogenology, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

ADAMS, GP; et. al. **Associação entre surtos de hormônio folículo-estimulante e o surgimento de ondas foliculares em novilhas**. Journal of Reproduction and Fertility, v. 94, p. 177-188, 1992.

AGÊNCIA BRASIL. **Rebanho bovino nacional teve aumento de 3,1% em 2021**. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2022-09/rebanho-bovino-nacional-teve-aumento-de-31-em-2021>. Acesso em: 05 setembro 2023.

ALMEIDA, G. L. P. et al. **Investimento em climatização na pré-ordenha de vacas girolando e seus efeitos na produção de leite**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 14, n. 12, p. 1337-1344, 2010.

ALMEIDA, J. et al. **Avaliação das taxas de prenhez em búfalas leiteiras submetidas a IATF com protocolos baseados em Ovsynch ou P4/E2 e eCG com sêmen refrigerado ou congelado durante estação reprodutiva favorável ou desfavorável**. Resumos: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), Reprodução Animal, v. 17, n. 3, 2020.

ANDRADE, B.H.A.; et. al.; **Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos**. Archives of Veterinary Science, v.17, n.4, p.70-82, 2012.

ARANA, D. G. **Comparação de critérios para predição da precocidade em novilhas Nelore**. 2019. 93p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2019. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Index ASBIA Mercado**, 2021. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-coment/uploads/2022/02/IndexAsbia-2021-M%C3%ADdia-3.pdf>. Acesso em:03 agosto 2023.

BARBOSA, L.A.L. **Uma breve história sobre a IATF em bubalinos na Amazônia**. 2019. 98 p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Setor de Reprodução

- Animal, ISPA. UFRA, Belém, 2019.
- BARUSELLI, P. S. **A sigla da qualidade superior dos bezerros. IATF.** Porto Alegre, n. 172. 16, p. 12-18, 2013.
- BARUSELLI, P. S. et. al.; **Avaliação da liberação de LH e da concentração de progesterona nos protocolos Ovsynch e Heatsynch em bubalinos (Bubalus bubalis).** Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia , São Paulo, v. 44, supl., p. 38-45, 2007.
- 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. 479-86, 2004.
- BARUSELLI, P.S, Ferreira, RM, Colli, MHA, Elliff, FM, & Sales, JNS (2021). **Evolução da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no Brasil e no mundo.** Revista Brasileira de Reprodução Animal , 45(1), 10-21.
- BARUSELLI, P.S. **Avaliação do mercado de IATF no Brasil.** Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1ª ed., 2019a. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 20 novembro 2023.
- BARUSELLI, P.S. **Comportamento sexual em búfalos.** In: Anais do 4º Congresso Mundial do Búfalo, São Paulo, Brasil. São Paulo: ABCB, 1994. p. 158-173.
- BARUSELLI, P.S. **Efeito do tempo de permanência (7 vs. 8) de diferentes dispositivos intravaginais de progesterona (PRIMER® Multidose ou Monodose) sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras.** Anim Reprod, v. 14, n. 3, p. 693, 2017.
- BARUSELLI, P.S. et al. **Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte.** In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. Anais... Paraná, 2006. p. 113-131.
- BARUSELLI, P.S. **Evolução da inseminação artificial em fêmeas bovinas de corte e de leite no Brasil.** Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 4ªed., 2020 Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 20 janeiro 2024.
- BARUSELLI, P.S. **Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos.** In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 1., 1999, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Funep, 1999. p. 126-142.
- BARUSELLI, P.S. **Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos.** Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 5ª ed., 2021. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 15 agosto 2023.
- BARUSELLI, P.S. **Requisitos básicos para inseminação artificial e transferência de embriões em bubalinos.** Buffalo Journal, v. 2, p. 53-60, 1994.
- BARUSELLI, P.S.; et. al.; **Fixed-time artificial insemination in buffalo.** Italian Journal

of Animal Science, v. 6, p.107-1118, 2007.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. **Uso de inseminação artificial versus monta natural em rebanhos de corte.** Animais, v. 12, p. 45-52, 2018.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. **Uso de tratamentos hormonais para melhorar o desempenho reprodutivo de bovinos de corte em anestro em climas tropicais.** Ciência da Reprodução Animal, v. 82, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. **History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil.** Animal Reproduction. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em:<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag139-152%20%28AR536%29.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BARUSELLI, P. S., et al. **Efeito de tratamentos hormonais para a sincronização da ovulação na eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras lactantes (Bubalus bubalis) durante a estação reprodutiva.** Theriogenology , v. 62, p. 132-142, 2004.

BARUSELLI, P. S. et al. **Synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (Bubalus bubalis).** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 40, p. 431-442, 2003

BARUSELLI, P. S. et al. **IATF em números: evolução e projeção futura.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2022.007>. Acesso em: 11 dez. 2024. , 2022

BASTIANETTO, E.; ESCRIVÃO, S. C.; OLIVEIRA, D. A. A. **Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 29, p. 49-52, 2005.

BINELLI, M. et al. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. Theriogenology, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BINELLI, M. et al. **Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, n. Supl 1, p. 1-7, 2006.

BINELLI, M. et al. **Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 1, p. 121-129, 2017.

BITTMAN, E. L.; KARSCH, F. J. **A duração noturna da secreção de melatonina pineal determina a resposta reprodutiva à duração inibitória do dia na ovelha.** Biologia da Reprodução, v. 30, p. 583-593, 1984.

BITTMAN, E. L.; KAYNARD, A. H.; OLSTER, D. H.; ROBINSON, J. E.; YELLON,

S. M.; KARSCH, F. J. **A melatonina pineal medeia o controle fotoperiódico da**

secreção pulsátil do hormônio luteinizante na ovelha. Neuroendocrinology, v. 40, p. 409-418, 1985.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MATINEZ, M. F. **Padrão e Manipulação do Desenvolvimento Folicular em Bovinos Bos indicus.** Ciência da Reprodução Animal, v. 78, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; Cutaia, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. **Tecnologias para inseminação artificial em tempo fixo e sua influência no desempenho reprodutivo de bovinos Bos indicus.** Soc Reprod Fertil Suppl, v. 64, p. 223-236, 2007.

BÓ, GA, et al. **Protocolos para IA em tempo fixo em bovinos.** Teriogenologia , v. 68, n. 4, pág. 214-243, 2007.

BORGESSE, A. **Technical Series 67.** Food and Agriculture Organization, Roma, Itália, 2005.

BORGHESE, A. **Buffalo production and research.** REU Technical Series 67. FAO Regional Office for Europe, 2005.

BRITO, L. F. C. et al. **Efficacy of PGF 2a to synchronize estrus in water buffalo cows (Bubalus bubalis) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment.** Animal Reproduction Science, v. 16, p. 23-35, 2002.

BURATINI, J. et al. **Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 190-196, 2007.

BUTTER, S. A. A.; et. al.; **Ovarian responses in Bos indicus heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F2 α and equine chorionic gonadotrophin.** Animal Reproduction Science, v. 129, p. 118-126, 2011.

CAETANO, G. A. O.; et. al.; **Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas.** PubVet, v.9, n.8, p.381-393, 2015.

CALLEJAS, S. S. et al. **Fisiologia do ciclo estral bovino.** In: PALMA, G. A. (Org.). **Biotecnologia de la reproducción.** Mar del Plata: Reprobiootec, 2001. p. 37-49.

CAMPANILE, G. et al. **Efeito da estação do ano, mortalidade embrionária tardia e produção de progesterona nas taxas de prenhez em búfalas pluríparas (Bubalus bubalis) após inseminação artificial com sêmen sexado.** Theriogenology, v. 79, n. 4, p. 653-659, 2013.

CARVALHO, et. al.; **Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus x Bos taurus and Bos**

taurus heifers. Theriogenology, v. 69, p. 167-175, 2008.

CARVALHO, N. A. T. et al. **Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season.** Theriogenology, v. 79, p. 423-428, 2013.

CASTILHO, E. F. **IATF como ferramenta no melhoramento genético de bovinos de leite.** In: CASTILHO, E. F. (org.). **Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos leiteiros.** 1. ed. Maringá: IEPEC. 2015. p. 148-191.

CHAIKHUN, T. et al. **Fertilidade de búfalas do brejo após a sincronização da ovulação pela administração sequencial de GnRH e PGF2 α combinada com inseminação artificial em tempo fixo.** Theriogenology, v. 74, n. 8, p. 1371-1376, 2010.

CHEBEL, R. C. et al. **Suplementação de progesterona via inserções de liberação controlada de droga interna durante protocolos de sincronização da ovulação em vacas leiteiras em lactação.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 3, p. 922-931, 2010.

CLEMENTE, M. et al. **Progesterona e alongamento do concepto em bovinos: efeito direto sobre o embrião ou efeito indireto via endométrio?** Reprodução, v. 138, n. 3, p. 507-517, 2009.

COUTO, G. A. B. **Reutilização de dispositivo intravaginal de progesterona na inseminação artificial em tempo fixo em búfalas criadas na região nordeste do Estado do Pará.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

CUNHA, E. A. et al. **Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelores lactantes acíclicas.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 65, n. 4, p. 975-980, 2013.

DAHLEN, C.; et. al.; **Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. Current and Future Reproductive.** Technologies and World Food Production. v.752, p.97-114, 2014.

DBO. **Anuário DBO 2022: os números da pecuária.** São Paulo: DBO Editores Associados, 2022.

DE GRAAFF, W.; GRIMARD, B. **Dispositivos de liberação de progesterona para indução e sincronização de estro bovino: Otimização do dispositivo para antecipar durações de tratamento mais curtas e novos desenvolvimentos de dispositivos.** Teriogenologia, 2017.

EMBRAPA, **manejo reprodutivo de búfalos com o uso de biotecnias da reprodução.** ISSN 1983-0513, maio. 2019.

FERRAZ JR, M. V. C. et al. **A combination of nutrition and genetics is able to reduce age at puberty in Nelore heifers to below 18 months.** animal, v. 12, n. 3, p. 569-574, 2018.

- FERREIRA, A. M. et al. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais Comuns (Causas e Tratamentos)**. Juiz de Fora: 1ª Edição, 2010.
- FIGUEIREDO, D.M.; et al. **Estratégias de suplementação para antecipação da idade à puberdade para novilhas de corte em pastagem tropical**. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v.30, n.4, p.415-423, 2008
- FORTUNE, J. E.; **Dinâmica folicular do ciclo estral bovino: um fator limitante na melhoria da fertilidade?**. *Animal Reproduction Science*, v.33, p. 111-125, 1993.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, L. et al. **Desenvolvimento folicular: o papel do microambiente folicular na seleção do folículo dominante**. *Ciência da Reprodução Animal*, v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A. et al. **Seleção folicular em ruminantes domésticos**. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 43, p. 187-198, 1991.
- FORTUNE, JE; et. al. **Diferenciação de folículos dominantes versus subordinados em bovinos**. *Biology of Reproduction* , v. 65, p. 648–654, 2001.
- FUNSTON, R. N.; MARTIN, J. L.; LARSON, D. M.; ROBERTS, A. J. **Physiology and endocrinology symposium: nutritional aspects of developing replacement heifers**. *Journal of Animal Science*, v. 90, n. 4, p. 1166-1171, 2012.
- FURTADO, D. A; et. al.; **Inseminação Artificial em Tempo Fixo em bovinos de corte**. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 2011.
- GEARY, T. W. et al. **Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncromate or the ovsynch protocol**. *Journal Animal Science*, v. 76, p. 1523-1527, 1998.
- GIMENES, et. al.; **Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers**. *Theriogenology*, v. 69, p. 852-858, 2008.
- GIMENES, L. U. **Study of follicle deviation and ovulatory capacity in buffaloes (Bubalus bubalis) and zebu cattle (Bos indicus)**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- GIMENES, L. U; et. al.; **Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers**. *Theriogenology*, v. 69, p. 852-858, 2008.
- GINTHER, J. O.; WILTBANK, M.C.; **Concentrações plasmáticas de PGFM e progesterona, momento de luteólise e duração do ciclo estral em vacas Nelore submetidas a biópsias uterinas**. *Arq. Sutiãs. Med. Veterinário. Zootec.* , v. 5, pág. 414-421, 2010.
- GINTHER, O. J. et al. **Associações temporais entre eventos ovarianos em bovinos durante ciclos de estro com duas e três ondas foliculares**. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J. et al. **Emergência e desvio de folículos durante o desenvolvimento de ondas foliculares em bovinos**. Theriogenology, v. 48, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J. et al. **Mecanismo de desvio folicular em espécies agrícolas monovulares**. Ciência da Reprodução Animal, v. 78, p. 239-257, 2003.

GORDON, I. **Reprodução controlada em bovinos e bubalinos**. Wallingford: CABI, 1996.

GREGORY, R. M.; AZEREDO, D. V. et al. **Protocolos de sincronização e indução de estros em novilhas e fêmeas de corte no Rio Grande do Sul**. In: CICLO DE PALESTRAS EM PRODUÇÃO E MANEJO DE BOVINOS, 13., 2008, Canoas. Anais... Canoas: ULBRA, 2008. p. 121-136.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Ciclos Reprodutivos**. In: **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri-SP: Ed. Manole, 2004. cap. 4, p. 55-67.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário de 2017**.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal>. Acesso em: 20 dezembro 2024.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanho de Bubalinos (Búfalos)**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos/br>.

KUMAR, R.; et. al.; **Plasma hormonal profiles during oestrous cycle of murrah buffalo heifers**. Indian Journal of Animal Sciences, v. 61, n. 4, p. 382-385, 1991.

LAZARINI, Italo Silva et al. **Prenhez em novilhas Nelore induzidas à puberdade, criadas na Amazônia Oriental Pregnancy in puberty-induced Nelore heifers, breeding in the eastern Amazon**. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 12, p. 119012-119022, 2021.

LEMES, K. M. **Comparação da eficiência de diferentes formulações à base de progesterona para indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça Nelore**. 2017. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018. doi:10.11606/T.10.2018.tde-15062018-163055. Acesso em: 2024-11-22.

LOBATO, J. F. P. et al. **Carne bovina brasileira produzida a pasto: sustentável e saudável**. Meat Science, v. 98, n. 3, p. 336-345, 2014.

LOPES, P.R., et. al.; **Importância e metodologias para mensuração dos esteroides sexuais em ruminantes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.39, n.3, p.322-328, 2015.

LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. et al. **Panorama da bubalinocultura na Amazônia.** In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1., 2008, Belém - PA. Anais... Belém: FAEPA, Instituto Frutal, SEBRAE-PA, 2008.

MAGGITTI JUNIOR, L. D. P. **Follicular dynamics, luteal function and moment of ovulation in FTAI protocols in buffaloes (*Bubalus bubalis*).** 2019. 53p. Dissertação/prédefesa (Requisito parcial. Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia. 2019.

MALPAUX, B. et al. **Biologia do fotoperiodismo mamífero e papel crítico da glândula pineal e da melatonina.** Journal of Biological Rhythms, v. 16, p. 336-347, 2001.

MANTOVANI, A. P. et al. **Aumento nas dimensões do folículo dominante e do corpo lúteo, da concentração plasmática de progesterona e da taxa de aproveitamento de receptoras de embrião bovino sincronizadas com CIDR-B por tempo prolongado.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 26, n. 3, p. 231-233, 2002

MARTINEZ, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. et al. **Sincronização da emergência da onda folicular e da ovulação para biotecnologias reprodutivas.** In: Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada, Londrina. Anais... Londrina, 2004. P. 26-55.

MARTINS, C. F.; et. al.; **Inseminação Artificial: uma tecnologia para o grande o pequeno produtor.** Planaltina-DF. Embrapa Cerrado. 2009.

MELDAU, R. **Indução da ovulação e sincronização do cio em fêmeas bovinas.** Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, [s.l.], 2007. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/06e9/420058922c4b57c30a50bebcced864b683d6.p df>. Acesso em: 5 março 2024.

MENEGHETTI, M. et al. **Inseminação artificial em tempo fixo com estradiol e progesterona para vacas *Bos indicus* I: base para desenvolvimento de protocolos.** Theriogenology, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.

MONGELLI, M. S.; et. al.; **Evolução e premissas dos protocolos hormonais de inseminação artificial em tempo fixo na pecuária.** Ciência Animal, v. 31, n. 1, p.119-133, 2021.

MOTA-ROJAS, D. et al. **The Use of Draught Animals in Rural Labour.** Animals (Basel), v. 11, n. 9, p. 2683, 2021. doi: 10.3390/ani11092683. PMID: 34573649; PMCID: PMC8471664.

NEVES SOUZA, J. et al. **Influência do diâmetro do folículo dominante e do GnRH na inseminação artificial em tempo fixo em búfalas, criadas na ilha do Marajó.** 2019. 40 p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNAMA, Belém, 2019.

NEVES, K. A. L. N. **Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de**

concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado, 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEGLIA G, et. al. **Reproductive management in buffalo by artificial insemination**. Theriogenology. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31982156/> Acesso: 02 novembro 2024.

NUR, Z. et al. **O uso de Co-synch e Ovsynch suplementados com progesterona para sincronização de estro e inseminação em tempo fixo em cabras Saanen nulíparas**. Jornal Turco de Ciências Veterinárias e Animais, v. 15, n. 37, p. 183-188, 2013.

OLIVEIRA FILHO, A. B. et al. **Estudo da involução uterina e do reinício da atividade folicular ovariana em vacas Canchim, com diferentes condições corporais ao parto**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 23, p. 164-167, 1999.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **Perspectivas Agrícolas 2015-2024**. Roma: FAO, 2015.

PARMEGGIANI, A. et al. **Níveis plasmáticos de melatonina em vacas búfalas**. In: simpósio internacional perspectivas da produção de búfalos no mediterrâneo e oriente médio, 1993, Doki (Cairo). Proceedings... EAPP Publication, v. 62, p. 401-403, 1993.

PATTERSON, D. J. **Revisão de sistema de sincronização do estro utilizando a progesterona oral Acetato de Melengestrol**. In: Novos Enfoques Na Perera, B. M. A. O. Et al. **Uma revisão de experiências com sincronização de estro em búfalas no Sri Lanka**. Buf J., v. 1, Supl., p. 105-114, 1987.

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

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

PERERA, B. M. A. O.; ABAYAWARDANA, S. A.; ABEYRATNE, G. A. **The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of buffaloes in Sri Lanka**. Animal Reproduction Science, v. 15, p. 201-208, 1987.

PFEIFER, L.F.M. et. al.; **Comparação de dois ésteres de estradiol como indutores da ovulação sobre o diâmetro folicular e os táxons de gestação de bovinos leiteiros submetidos a um programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 4, pág. 873-880, 2015.

PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K.; SINGH, I. **Sazonalidade na reprodução de búfalos**. Jornal Internacional de Ciências Vegetais, Animais e Ambientais, v. 6, p. 46-54, 2016.

PORTO FILHO, A. M. et al. **Redução da dosagem de eCG em um protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo durante a entressafra em búfalos**. In: SIMPÓSIO DE BUFFALO DAS AMÉRICAS, 2., 2004, Corrientes. Anais... CD-ROM.

PORTO-FILHO, R. M. **Emprego da radiotelemetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais.** 2000. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILT BANK, M. C. **Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation.** Journal of Dairy Science, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. **Manejo reprodutivo de vacas leiteiras em lactação usando a sincronização da ovulação.** Revista Dairy Science, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. **Sincronização da ovulação em vacas leiteiras usando PGF2 α e GnRH.** Theriogenology, v. 44, p. 915-923, 1995.

QURESHI, M. S.; KHAN, M. A.; JAVED, M. T.; ALI, A.; MASOODA, N. **Milk progesterone profiles in cycling and non-cycling buffaloes under field conditions.** Reproduction in Domestic Animals, v. 42, p. 471-476, 2007.

RAUTELA, R.; et. al., **Impacto da idade ao primeiro parto na fertilidade e no desempenho de produção em búfalos Murrah.** *Reprodução em Animais Domésticos*, v. 59, p. e14691, 2024. DOI: [10.1111 /rda.14691](https://doi.org/10.1111/rda.14691) .

REECE, W. O. **Fisiologia de animais domésticos.** 1. ed. São Paulo: Roca, p. 281-311, 1996.

REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos.** 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

RESTLE, J.; et. al. **Efeito de grupo genético e heterose sobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 4, pág. 701-707, 1999.

RHODES, F. M. et al. **Tratamento de vacas com intervalo prolongado de anestro pós-parto.** J Dairy Sci, v. 86, p. 1876-1894, 2002.

RIBEIRO, E. S. et al. **Características do manejo reprodutivo em búfalas na Amazônia, Curitiba, PR, 2002.** In: Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, 1., 2002, Curitiba. Anais... Curitiba: v. 1, p. 101-104, 2002.

RIBEIRO, E. S. et al. **Fertilidade em vacas leiteiras após pré-sincronização e administração do dobro da dose luteolítica de prostaglandina F2 α como uma ou duas injeções no protocolo de inseminação artificial cronometrada de 5 dias.** Theriogenology, v. 78, n. 2, p. 273-284, 2012.

ROCHA, R. M. P. et al. **Melatonina e reprodução animal: intuitiva na fisiologia ovariana.** Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, p. 147-157, 2011.

- RODGERS, J. C. et al. **Avaliação econômica da sincronização do estro e da inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte lactentes.** J Anim Sci, v. 10, p. 1297-1308, 2015.
- ROELOFS, J. B.; et. al.; **Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle.** Theriogenology, v. 66, p.2173-2181, 2006.
- ROSA, A. et al. **Eficiência reprodutiva em búfalos.** Reprodução em Animais Domésticos, v. 45, n. 4, p. 668-681, 2010.
- SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. **Factors affecting puberty in Bos indicus and Bos taurus heifers raised under tropical conditions.** Theriogenology, v. 89, p. 238-244, 2017.
- SÁ FILHO, M. F.; et. al.; **Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows.** Animal Reproduction Science, v. 120, p. 23-30, 2010.
- SÁ FILHO, et al. **Dinâmica folicular de novilhas Bos indicus tratadas com implante auricular de Norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progeterona.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p. 266, 2005a.
- SÁ FILHO, et al. **Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p. 265, 2005b.
- SÁ FILHO, MF, et al. **Protocolos de inseminação artificial em tempo fixo para vacas Bos indicus.** Animal Reproduction Science , v. 120, p. 204-210, 2010.
- SÁ FILHO, O.G.; et. al.; **Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows.** Animal Reproduction Science, v. 112, p. 95- 106, 2009.
- SALES, JNS, et al. **Uso de concentrações de progesterona circulante para melhorar a fertilidade em gado.** Reproduction, Fertility and Development , v. 24, n. 1, p. 105-115, 2012.
- SILVA, E. I. C. **Fisiologia do Ciclo Estral dos Animais Domésticos.** 1. ed. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2021.
- SINGH, J.; et. al.; **The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes.** Animal Reproduction Science, v.60, p.593-604, 2000.
- SIQUEIRA, J. B., et. al.; **Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 33, 139-148. 2009.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E.; **Dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral em novilhas: um estudo sobre os efeitos do hormônio folículo-estimulante e do estradiol na seleção folicular.** Journal of Reproduction and Fertility , v. 82, p. 665-671, 1988.

SOUTO, P..F. et. al.; **Reproductive efficiency of Nelore (Bos indicus) cows subject to both ftai and homeopathic supplementation.** Bioscience Journal, v.35, n.1, p. 251-259, 2019.

SOUSA, R.T.; et al. **Fatores relacionados ao desenvolvimento reprodutivo em novilhas Nelore: Revisão.** Pubvet, v.12, n.5, a82, p.1-10, 2018

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. **Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters.** Endocrinology, v. 132, p. 1108-1114, 1993.

TAPONEN, J. et al. **Induction of ovulation with gonadotropin-releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function.** Animal Reproduction Science, v. 55, p. 91-105, 1999

TELLES, M. M., et. al.; **A unidade hipotálamo-hipófise.** In: Ribeiro, E.B. Fisiologia endócrina. Manole, 1ª ed., p. 1-32, 2012.

VALE, W. G. & RIBEIRO, H. F. L. 2005. **Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 29, 63-73.

VASCONCELOS, J. L. M.; et. al.; **Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate.** Theriogenology, v. 56, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M.; et al. **Efeitos de diferentes protocolos de sincronização de estro na dinâmica folicular, tempo de ovulação e fertilidade em vacas leiteiras.** Animal Reproduction Science , v. 85, p. 85-92, 2009.

VASCONCELOS, J.L.M.; et al. **Manejo reprodutivo do gado Nelore.** Animal Reproduction Science , v. 85, p. 85-92, 2009.

VILELA, D.; et. al. **Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia de manejo das pastagens.** Revista Brasileira de Zootecnia , v. 38, pág. 147-159, 2009.

VRISMAN, D.P. **Indução da ovulação e funcionalidade do corpo lúteo em novidades Nelore pré-púberes.** 2017. Dissertação (Mestrado) — Universidade de origem, Local, 2017.