

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**GRASSIELE GASSENFERTH**

**A SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL  
EM TEMPO FIXO: EFEITOS SOBRE O FOLÍCULO DOMINANTE E TAXA DE  
PRENHEZ DE VACAS DE CORTE *BOS TAURUS INDICUS* E *BOS TAURUS  
TAURUS***

(The recombinant bovine somatotrophin in timed-artificial insemination: effects on dominant follicle and pregnancy rate in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* beef cows)

**CURITIBA**

**2019**

**GRASSIELE GASSENFERTH**

**A SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL  
EM TEMPO FIXO: EFEITOS SOBRE O FOLÍCULO DOMINANTE E TAXA DE  
PRENHEZ DE VACAS DE CORTE *BOS TAURUS INDICUS* E *BOS TAURUS  
TAURUS***

(The recombinant bovine somatotrophin in timed-artificial insemination: effects on dominant follicle and pregnancy rate in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* beef cows)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

**CURITIBA**

**2019**

**ATA Nº 0142 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA GRASSIELE GASSENFERTH**

Aos trinta dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezenove, às 14 horas, realizou-se na sala Tele Saúde, 1º andar, Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa de dissertação da mestranda Grassiele Gassenferth, intitulada: “A SOMATOTROFINA BOVINA RECOMBINANTE ASSOCIADA À PROGESTERONA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO: EFEITOS SOBRE O FOLÍCULO DOMINANTE E TAXA DE PRENHEZ DE VACAS ZEBUÍNAS E TAURINAS DE CORTE”. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor Orientador e Presidente da banca, Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Cristina Santos Sotomaior (PUCPR) e Roberto Sartori Filho (USP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

**Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (Presidente)**

Assinatura \_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior (PUCPR)**

Assinatura \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Roberto Sartori Filho (USP)**

Assinatura \_\_\_\_\_

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 30 de outubro de 2019.

*Caroline Nocera Bertton*

**Caroline Nocera Bertton**

**Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

*Renata Ernandes Freitas de Macedo*

**Profa. Dra. Renata Ernandes Freitas de Macedo**

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....	1
1.2 A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) CONVENCIONAL E A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF).....	2
1.3 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (ECG).....	3
1.4 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO BOVINO (GH) E SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA (RBST) .....	4
1.4.1 EIXO SOMATOTRÓFICO: SÍNTESE, LIBERAÇÃO E AÇÃO DO GH.....	4
1.4.2 FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA TIPOS 1 E 2 (IGF1 E IGF2).....	7
1.4.3 EFEITOS DA RBST SOBRE A PRODUÇÃO LEITEIRA E REPRODUÇÃO .....	8
1.5 CONSIDERAÇÕES DO ECC SOBRE HORMÔNIOS METABÓLICOS E REPRODUÇÃO.....	10
1.6 PARTICULARIDADES METABÓLICAS E REPRODUTIVAS ENTRE BOS TAURUS TAURUS E BOS TAURUS INDICUS.....	12
1.6.1 DOSAGENS DA RBST E MÉRITO GENÉTICO.....	14
1.7 OBJETIVO DO TRABALHO .....	15
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>16</b>
ARTIGO (A SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO: EFEITOS SOBRE O FOLÍCULO DOMINANTE E TAXA DE PREENHEZ DE VACAS DE CORTE <i>BOS TAURUS INDICUS</i> E <i>BOS TAURUS TAURUS</i> ).....	16
RESUMO.....	16

ABSTRACT .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. MATERIAIS E MÉTODO .....	21
2.1 LOCALIZAÇÃO E ANIMAIS .....	21
2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	22
2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	22
2.4 GRUPOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	22
2.5 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO E DINÂMICA FOLICULAR .....	24
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
3.1 ESTUDO 1.....	26
3.2 ESTUDO 2.....	32
3.3 ESTUDO 3.....	34
4. CONCLUSÕES .....	37
AGRADECIMENTOS .....	38
REFERÊNCIAS .....	38
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>50</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
ANEXO 1. GUIA RESUMIDO PARA A SUBMISSÃO DE ARTIGO PARA A REVISTA THERIOGENOLOGY .....	65
ANEXO 2. PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA PUCPR .....	81

*Aos meus pais,  
por fazerem pelas filhas o possível e o impossível  
para que pudéssemos realizar nossos sonhos.*

*Aos meus avós,  
pelo mais puro amor transmitido aos netos,  
e por nos ensinarem a respeitar e amar os animais.*

*Ao meu companheiro de vida,  
por estar sempre ao meu lado,  
me apoiando e incentivando em todos os momentos.*

*A todos vocês,  
fontes de minha admiração e resiliência,  
dedico.*

Dedicatória

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades, por todas as belezas e desafios colocados em meu caminho. Compreendi que o trilhar é a melhor forma de enriquecimento e fortalecimento, e que Ele sempre estará ao nosso lado para nos levantar.

Aos meus amados pais, Adalberto Gassenferth Júnior e Leodemara Coelho Gassenferth, que me ensinaram o brilho da vida, a agarrar as oportunidades, a alçar vôos cada vez mais altos sem medo. Sem vocês, eu nada seria.

Às minhas irmãs Aline e Larissa Gassenferth e a toda minha família, em especial aos meus queridos avós Celina Loch Coelho, Zélia Maria Gassenferth, José Ethevaldo Coelho e Adalberto Gassenferth (*in memoriam*). Vocês, que sempre me apoiaram, independente de onde estivessem, e compreenderam que minha ausência seria e é passageira. Não importa para onde eu vá, sempre saberei para que ninho voltar.

Ao meu segundo lar, família Rosa e Cruz, deixo aqui meu carinho e eterna gratidão, por todo amor, apoio e incentivo.

Ao meu amor e companheiro, João Carlos da Rosa Sobrinho, que literalmente vestiu a camisa e as botas comigo, e embarcou junto a mim nesta grande jornada. Foram muitos quilômetros, noites curtas e dias longos. Mas como gostamos de dizer, ao final da “lida”, mesmo que esta seja árdua e cansativa, há sempre um belo entardecer a ser contemplado, com os animais retornando ao horizonte, aquele delicioso aroma do campo e a satisfação do dever cumprido.

Ao meu ilustre professor orientador Dr. Luiz Ernandes Kozicki, que desde minha época como residente, me acolheu e incentivou a continuar no caminho da sede pelo conhecimento. Obrigada por me dar a honra de ter ao lado um grande mestre como o senhor.

Aos demais mestres, que tanto me ensinaram nestes anos como mestranda – e como residente, deixo também minha gratidão! Vocês são nossos exemplos e fonte de admiração. Levo comigo um pouco de cada um de vocês.

Às meninas do PPGCA, obrigada por todos os lembretes de relatórios, matérias, compromissos, e muitas vezes, pelos conselhos. Vocês também fazem parte desta jornada.

Aos proprietários das fazendas, Ângelo, Neilor e Sidney e famílias, por confiarem a nós seus animais, espaço e tempo, nos acolhendo muitas vezes como membros de suas próprias famílias. Estendo este agradecimento ao Médico Veterinário Zé, que também nos auxiliou na maior parte dos trabalhos, fazendo com que fossem possíveis. Pessoas como vocês são extraordinárias, agradeço por tê-los conhecido.

A cada um dos demais colaboradores das fazendas, por todo o trabalho, tempo e disposição. Vocês foram peças fundamentais neste estudo e agradeço-lhes imensamente. Vamos sempre guardá-los na lembrança.

Aos meus queridos amigos: Josiane Mendes e família, uns de meus maiores incentivadores. Você Jô, como mãe e amiga, com seu imenso coração. Stephany, Fernanda, Cássia e Carol. Vocês, que já me acompanham há muito tempo, que compreenderam que eu precisaria estar ausente, e mesmo estando, não deixaram de me apoiar e oferecer sua amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos concedida. À empresa Elanco pela doação do hormônio rbST, em pró da busca por novos conhecimentos.

Aos meus colegas e supervisores de trabalho, pelo apoio e por me permitirem flexibilizar meus horários para que eu pudesse estar a campo realizando a pesquisa.

Por fim, mas não menos importante, aos animais, pelos quais tenho imenso respeito e carinho. Vocês são um dos motivos pelos quais buscamos o crescimento contínuo como profissionais e seres humanos.

*A todos e a cada um de vocês, minha gratidão!*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Atresia Folicular  
BE – Benzoato de Estradiol  
BEN – Balanço Energético Negativo  
BEP – Balanço Energético Positivo  
CE – Cipionato de Estradiol  
CF – Crescimento Folicular  
CL – Corpo Lúteo  
D – Dia  
DG – Diagnóstico de Gestação  
DPP – Dias Pós-parto  
E2 – Estradiol  
ECC – Escore de Condição Corporal  
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina  
FD – Folículo Dominante  
FPO – Folículo Pré-ovulatório  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GH – Hormônio do Crescimento  
GHBP – Proteínas de Ligação do Hormônio do Crescimento  
GHR – Receptor de Hormônio do Crescimento  
GHRH – Hormônio Liberador de Hormônio do Crescimento  
GLUT1 – Transportador de Glicose 1  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
IA – Inseminação Artificial  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
IEP – Intervalo Entre Partos  
IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina  
IGFBP – Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina  
IGFR – Receptor de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina  
IM – Intramuscular  
LH – Hormônio Luteinizante  
N – Número de Animais

NH<sub>2</sub> – Radical Amina

P – P-valor

P<sub>4</sub> – Progesterona

PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

rbST – Somatotrofina Recombinante Bovina

SC – Subcutânea

TAF – Taxa de Atresia Folicular

TCF – Taxa de Crescimento Folicular

TO – Taxa de Ovulação

TP – Taxa de Prenhez

US - Ultrassonografia

## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, com a contextualização do tema e os objetivos do estudo. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

Como nova alternativa aos protocolos reprodutivos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a somatotrofina recombinante bovina (rbST) surge como adicional, possibilitando maior número, desenvolvimento e maturação de folículos ovarianos, melhora nas taxas de prenhez (TP) e desenvolvimento inicial embrionário. O presente estudo verificou a eficiência da rbST sobre a TP (%), diâmetro do folículo dominante ( $\varnothing$ FD, mm) e pré-ovulatório ( $\varnothing$ FPO, mm), taxa de crescimento folicular (TCF, mm) e de atresia folicular (TAF, mm) após a retirada da progesterona em vacas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram realizados três estudos com o total de 353 vacas múltiparas oriundas de três fazendas: Estudo 1 (fazenda 1; n = 150; vacas *Bos taurus indicus*; Nelore; escore de condição corporal [ECC] 2,5 – mediana); Estudo 2 (fazenda 2; n = 92; vacas *Bos taurus indicus*; Nelore; ECC 3,0); Estudo 3 (fazenda 3; n = 111; vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas; Aberdeen e Red Angus e Brangus; ECC 3,5). Em cada estudo os grupos foram constituídos, respectivamente (estudos 1, 2 e 3), por: grupo rbST no dia zero (GbSTd0; n = 31, 31 e 40 animais), grupo rbST no dia oito (GbSTd8; n = 31, 31 e 37) e grupo controle (GC; n = 42, 30 e 34). O GbSTd0 recebeu no d0 um dispositivo intravaginal com P4 (1,0 g) + BE (2,0 mg, IM) + rbST (250 mg, SC); no d8 ocorreu a retirada do dispositivo + D-cloprostenol (150 mg, IM) + CE (0,5 mg, IM); no d10 executou-se a IATF. O GbSTd8 recebeu idêntico protocolo, exceto o dia no qual a rbST foi administrada, sendo neste grupo ao d8. O GC recebeu o mesmo tratamento que GbSTd0, exceto a não aplicação da rbST. No estudo 1, adicionou-se um grupo eCG (GeCG; n = 46), o qual recebeu idêntico tratamento ao GC + eCG (300 UI, IM) no d8. Os folículos ovarianos foram avaliados por exames ultrassonográficos (US) nos dias d0, d8 e d10 dos protocolos. Foram calculadas as TP e as TCF e TAF do d8 ao d10. As TPs à IATF resultaram respectivamente 16,1%, 19,4%, 30,9% e 43,4%; 32,2%, 38,7% e 40,0%; 65,0%, 37,8% e 41,1%, nos GbSTd0, GbSTd8, GC e GeCG, para os estudos 1, 2 e 3. No estudo 1, o GeCG resultou em maior  $\varnothing$ FPO (11,2 $\pm$ 1,5 vs. 9,6 $\pm$ 0,5 no GbSTd0; 9,9 $\pm$ 0,8 no GbSTd8; e 10,1 $\pm$ 1,3 no GC) e maior TCF (2,20 $\pm$ 1,03 vs. 0,93 $\pm$ 0,50 no GbSTd0; 0,94 $\pm$ 0,52 no GbSTd8; e 1,17 $\pm$ 0,64 no GC) (P<0,05). No estudo 2 a TCF observada no GbSTd8 foi superior às demais (3,19 $\pm$ 1,27 vs. 2,25 $\pm$ 0,87 do GbSTd0; e 1,64 $\pm$ 0,86 do GC). No estudo 3, ocorreu diferença (P<0,05) em prol do

GbSTd0 ao se comparar as TP e as TCF entre os grupos ( $3,12 \pm 1,15$  vs.  $2,27 \pm 1,38$  e  $1,60 \pm 1,30$  para GbSTd0, GbSTd8 e GC respectivamente), assim como o  $\emptyset$ FPO vs. GbSTd8 ( $14,0 \pm 1,4$  vs.  $12,9 \pm 1,8$  respectivamente). Diferenças nas TAF não foram verificadas. Concluiu-se que o protocolo com a eCG demonstrou ser mais eficiente sobre a TCF e  $\emptyset$ FPO em vacas *Bos taurus indicus* com ECC 2,5 frente aos demais grupos. A rbST aplicada ao d8 do protocolo (GbSTd8) em vacas *Bos taurus indicus* com ECC 3,0 resultou em maior TCF quando comparada à aplicação ao d0 e à não aplicação. A rbST administrada no d0 do protocolo incrementou a TP e proporcionou maior TCF quando em vacas *Bos taurus taurus* e/ou cruzadas com ECC 3,5. No entanto, ainda são superficiais os conhecimentos sobre as ações da rbST na reprodução bovina, como dosagens e momentos de administração, sendo este estudo considerado um passo adicional nesta direção.

**Palavras-chave:** Somatotrofina recombinante bovina, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, Brangus, Dinâmica Folicular, IATF.

## ABSTRACT

Alternatively to reproductive protocols for timed-artificial insemination (TAI), the recombinant bovine somatotrophin (rbST) appears as an additional alternative that can increase the number of ovarian follicles as well as its growing and maturation; improvements both pregnancy rate (PR) and the early development embryonic. The study aimed to verify the reproductive efficiency rbST on PR (%), dominant follicle diameter ( $\varnothing$ DF, mm) and preovulatory follicle diameter ( $\varnothing$ POF, mm), follicular growth rate (FGR, mm) and follicular atresia rate (FAR, mm) after progesterone withdrawal in cows submitted to TAI protocols. Three studies were conducted in 353 cows from three farms: Study 1 (farm 1; n = 150; *Bos taurus indicus* cows; Nelore, mean BCS 2.5); Study 2 (farm 2; n = 92; *Bos taurus indicus* cows; Nelore; BCS 3.0); Study 3 (farm 3; n = 111; *Bos taurus taurus*; Aberdeen angus and Brangus; BCS 3.5). In each study the groups were assembled respectively as follows: day zero rbST group (GbSTd0; n = 31, 31 and 40 animals), day eight rbST group (GbSTd8; n = 31, 31 and 37) and control group (CG; n = 42, 30 and 34). GbSTd0 received on d0 an intravaginal device with P4 (1.0 g) + EB (2.0 mg, IM) + rbST (250 mg, SC); on d8 P4 removal + D- cloprostenol (150 mg, IM) + EC (0.5 mg, IM); on d10 FTAI was performed. GbSTd8 received the same protocol except rbST, which was administered on d8. The CG received the same treatment as GbSTd0, except for the application of rbST. In study 1, an eCG group (GeCG; n = 46) was added which received identical treatment to GC + eCG (300 UI, IM) on d8. Ovarian follicles were evaluated by ultrasound examinations (US) on days d0, d8 and d10 of the protocols. PR, FGR and FAR from d8 to d10 were evaluated. PR at TAI resulted respectively 16.1%, 19.4%, 30.9% and 43.4%; 32.2%, 38.7% and 40.0%, and 65.0%, 37.8% and 41.1% in GbSTd0, GbSTd8, GC and GeCG in studies 1, 2 and 3. In study 1, GeCG resulted in the biggest diameter of the  $\varnothing$ POF ( $11.2 \pm 1.5$  vs.  $9.6 \pm 0.5$  [GbSTd0];  $9.9 \pm 0.8$  [GbSTd8]; and  $10.1 \pm 1.3$  [GC]) and the highest FGR ( $2.20 \pm 1.03$  vs.  $0.93 \pm 0.50$  [GbSTd0];  $0.94 \pm 0.52$  [GbSTd8];  $1.17 \pm 0.64$  [GC]) ( $P < 0.05$ ). In study 2, the FGR in GbSTd8 was higher than the others ( $3.19 \pm 1.27$  vs.  $2.25 \pm 0.87$  [GbSTd0]; and  $1.64 \pm 0.86$  [CG]). In study 3, there was a difference ( $P < 0.05$ ) in favor to GbSTd0 when comparing the PR and the FGR between the groups ( $3.12 \pm 1.15$  vs.  $2.27 \pm 1.38$  and  $1.60 \pm 1.3$  for GbSTd0, GbSTd8 and CG respectively), and  $\varnothing$ FPO vs. GbSTd8 ( $14.0 \pm 1.4$  vs.  $12.9 \pm 1.8$  respectively). Differences

in TAF were not verified. It was concluded that the protocol with eCG was more effective in FGR and  $\emptyset$ POF in *Bos taurus indicus* cows with BCS 2.5 than the other groups. The rbST administered at d8 of the protocol (GbSTd8) in *Bos taurus indicus* with BCS 3.0 resulted in the highest FGR when compared to administration on d0 and non-administration. The bST administered at d0 of the protocol in *Bos taurus taurus* cows with BCS 3.5 increased PR and obtained the highest FGR. However, the knowledge about the rbST effect in cattle reproduction is shallow yet, as the dosage and application time. This research support as additional tool to find better working ways for this hormone.

**Keywords:** Recombinant Bovine Somatotrophin. *Bos taurus taurus*. *Bos taurus indicus*. Brangus. Follicular Dynamics. TAI.

# CAPITULO 1

## INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 Contextualização

Com mais de 213 milhões de cabeças, o efetivo brasileiro de bovinos é composto aproximadamente por 80% de *Bos taurus indicus* (IBGE, 2018a). Apesar de ser considerado o maior rebanho comercial do mundo, o Brasil ostenta a segunda colocação em produção de carne e a quarta colocação em produção de leite no *ranking* mundial (ABIEC, 2018; IBGE, 2018b).

Para a melhoria deste quadro, faz-se necessária a adoção de boas técnicas de manejo (sanitário, nutricional e reprodutivo), assim como a busca por biotécnicas capazes de superar obstáculos (Baruselli et al., 2012a). Como ferramenta de melhoria, a inseminação artificial (IA) trouxe vantagens sobre a monta natural, como o melhoramento genético, o controle de doenças venéreas e a qualidade dos bezerros (Rodgers et al., 2015; Lamb e Mercadante, 2016; Baruselli et al., 2017; 2018). Atualmente cerca de 13,1% das 72,5 milhões de matrizes bovinas em idade reprodutiva são inseminadas artificialmente no Brasil, atribuindo este baixo percentual à dificuldade na detecção de estro (Severo, 2009b; ANUALPEC, 2018).

Neste contexto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) entra como uma das biotecnologias mais eficientes existentes e utilizadas atualmente (Baruselli et al., 2012a; Standerholen et al., 2015), trazendo como benefício, dentre vários outros, a não necessidade de detecção de estro (Rhodes et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2007). Cerca de 15,4 milhões de doses de sêmen foram comercializadas no Brasil em 2018, representando um crescimento de 13,7% em comparação ao ano anterior (ASBIA, 2017; Baruselli, 2019a). Além disso, cerca de 13,3 milhões de protocolos de IATF foram comercializados no ano de 2018, com aumento de 16,1% em relação a 2017 (ASBIA; 2017; Baruselli, 2019a). Isso indica que cerca de 86% das inseminações foram derivadas da IATF (Baruselli, 2019a), fato que demonstra a consolidação desta biotecnologia no mercado nacional.

## **1.2 A Inseminação Artificial (IA) convencional e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

A IA surgiu como um importante marco para a reprodução animal, sendo a biotécnica mais antiga, de mais simples aplicação, maior impacto, baixo custo (Neves et al., 2010, Emerick et al., 2011) e principal meio de expansão genética (Severo, 2009a). Apesar disso, a IA possui limitações (Gaievski et al., 2015), sendo a detecção de estro seu maior fator limitante (Severo, 2009b).

Com os avanços em relação à dinâmica folicular e à fisiologia ovariana (Savio et al., 1988; Sirois e Fortune, 1988) tratamentos hormonais que visam a sincronização e o crescimento folicular ovariano tornaram-se possíveis e cada vez mais frequentes dentro dos rebanhos, descartando a necessidade de observação de estro com o emprego da IATF (Fernandes et al., 2001, Sá Filho et al., 2011; Baruselli et al., 2012a; Martins et al., 2017). Com o uso desta ferramenta maximizaram-se os índices reprodutivos do rebanho, uma vez que ela permite a inseminação de vacas em lactação/bezerro ao pé e/ou em anestro, reduz o intervalo entre partos (IEP), concentra os partos dando homogeneidade aos grupos de bezerros, gera aumento de peso e número de animais ao desmame, possibilita o ganho genético e reduz a mão de obra, gerando um melhor custo-benefício à atividade (Sá Filho et al., 2013; Rodgers et al., 2015; Baruselli et al., 2018).

São diversos os protocolos hormonais já existentes, sendo a combinação entre a progesterona (P4) e estradiol (E2) o tratamento hormonal mais comumente aplicado (Bó et al., 2002; Carvalho et al., 2008, Sá Filho et al. 2011), capaz de resultar em taxas de prenhez (TP) entre 40% a 60% (Cutaia et al., 2003; Baruselli et al., 2004). De modo geral, ao início do protocolo (dia 0 – d0), cada fêmea recebe um dispositivo de liberação lenta de P4 juntamente a um éster de E2 (benzoato de estradiol – BE), induzindo o surgimento de uma nova onda folicular 3 a 3,5 dias depois (Macmillan e Thatcher, 1991; Bó et al., 2002, 2003; Sá Filho et al., 2011). Ao oitavo dia (d8), o dispositivo de P4 é retirado e uma dose de agente luteolítico (prostaglandina F<sub>2</sub>α – PGF<sub>2</sub>α) é administrada – assegurando a luteólise de qualquer corpo lúteo (CL) existente, visando reduzir ao máximo as concentrações de P4 circulante (Bartolome et al., 2002; Sá Filho et al., 2011). Passadas 24 horas, ao d9, aplica-se uma nova dose de BE, agora

como indutor da ovulação, com realização da IATF em 24 a 36 horas depois (Bartolome et al., 2002; Sá Filho et al., 2011). Uma das variações mais comuns deste protocolo, é o emprego do cipionato de estradiol (CE) juntamente à retirada do dispositivo de P4 ao d8, com a IATF 48 horas mais tarde, reduzindo a necessidade de mais um manejo das matrizes bovinas (Sá Filho et al., 2011; Torres-Júnior et al., 2014).

Estudos continuam sendo conduzidos em busca do protocolo hormonal mais adequado, inserindo alternativas, doses e diferentes combinações hormonais, que levem ao maior sucesso e ao melhor custo/benefício da atividade, tornando-a viável a cada tipo e categoria animal (Baruselli et al., 2018).

### **1.3 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)**

A gonadotrofina coriônica equina (eCG), uma glicoproteína secretada pelas taças endometriais de éguas prenhes (Murphy e Martinuk, 1991), vem sendo amplamente utilizada para maximizar resultados em programas de IATF, especialmente quando aplicados a *Bos taurus indicus* (Baruselli et al., 2012b; Bó et al., 2016).

Por apresentar atividade semelhante a dois importantes hormônios reprodutivos – o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), além de possuir longa meia-vida (Murphy e Martinuk, 1991), a eCG apresenta a capacidade de otimizar o crescimento folicular ovariano, acarretando maiores dimensões ao CL subsequente, bem como maiores concentrações de P4, contribuindo para a manutenção gestacional (Lonergan et al., 2013; Bó et al., 2016). Assim sendo, quando aplicada no momento da remoção do implante de P4, proporciona aumento das taxas de ovulação (TO), de crescimento (TCR) e TP, especialmente em fêmeas apresentando baixo escore de condição corporal (ECC) e/ou anestro pós-parto (Sales et al., 2011; Pessoa et al., 2016).

Portanto, a eCG representa uma significativa estratégia para melhorar a eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos de corte, principalmente tratando-se de rebanhos constituídos por animais *Bos taurus indicus* (Baruselli et al., 2004; Pessoa et al., 2016).

No entanto, na incessante busca por melhores resultados e, em reflexo às descobertas fisiológicas que surgem a cada dia, novas alternativas devem ser consideradas, pesquisadas, e amplamente estudadas, visando progressos da reprodução bovina.

#### **1.4 Hormônio de crescimento bovino (GH) e Somatotrofina recombinante bovina (rbST)**

Conhecido há algumas décadas, o hormônio de crescimento bovino (GH) é produzido e secretado pela adenohipófise (Etherton e Bauman, 1998). Além de regular o crescimento e a diferenciação celular, o GH exerce importante influência sobre a atividade metabólica de diversos tecidos do organismo (Kuzmina et al., 2006).

A somatotrofina recombinante bovina (rbST), constitui-se em análogo sintético do GH, produzida a partir de tecnologia molecular de recombinação de DNA (Bauman et al., 1982). A rbST tem como diferencial ao GH a adição de uma metionina em sua terminação de radical amina ( $\text{NH}_2$ ), apresentando 190 aminoácidos e uma leucina ocupando a posição 127 (Posilac 500 mg, Monsanto Co., St. Louis, Missouri, EUA; Bayer, Leverkusen, Nordrhein-Westfalen, Alemanha). O peso molecular entre GH e a rbST difere, apresentando o GH massa molecular de 21725 a 21796 Dalton, e a rbST o valor de 22103 Dalton (Scippo et al., 1997).

O organismo animal responde ao GH, endógeno ou sintético (rbST), tanto de maneira direta como indireta, por meio da síntese e secreção do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF1) por intermédio do eixo somatotrófico (Etherton e Bauman, 1998).

##### **1.4.1 Eixo somatotrófico: síntese, liberação e ação do GH**

A síntese e secreção do GH é regulada principalmente pelo hormônio liberador de GH (GHRH) e pela somatostatina, sendo que esta bloqueia sua secreção, mas não interfere em sua produção (Cuttler, 1996). Ambos são os principais hormônios – peptídeos hipotalâmicos, responsáveis pela regulação de GH (Cuttler, 1996). Entretanto, o sistema de regulação de GH envolve não só estes, mas vários outros fatores, que vão de hormônios e receptores à fatores

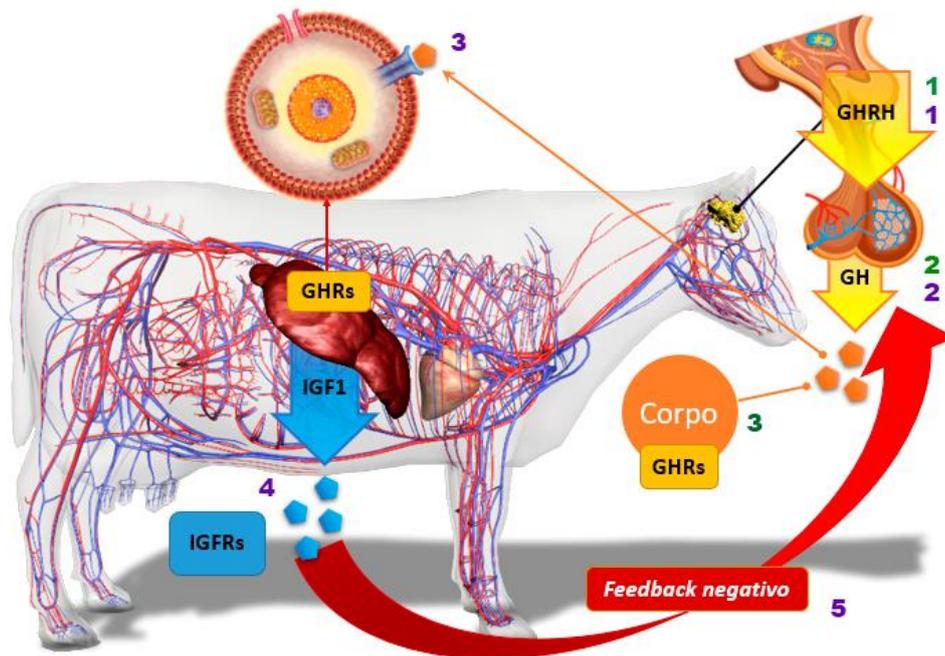
ligados à idade, ECC, sexo, ingestão de matéria seca, nível de estresse e exercícios (Etherton e Bauman, 1998).

O mecanismo regulador da produção e liberação do GH é denominado “eixo somatotrófico”, e por meio dele muitos aspectos de crescimento, metabolismo e fisiologia dos animais são controlados (Bauman et al., 1985; 1999), sendo a reprodução e a lactação importantes processos influenciados por ele (Etherton e Bauman, 1998; Lucy, 2011). Esse eixo é composto pelo GHRH, proteínas de ligação (GHBP e IGFBP 1-2-3-4-5-6), receptores celulares (GHRs e IGFRs), além de fatores de crescimento semelhante a insulina tipos 1 e 2 (IGF1 e IGF2), somatostatina, ghrelina e leptina (Etherton e Bauman, 1998; Lucy, 2011).

Por existirem GHRs em quase todos os tecidos corporais, o GH tem capacidade de exercer função em quase todo o corpo quando liberado pela pituitária (Kirby et al., 1996). Células do cumulus dos oócitos, embrionárias, trofoblastos, ovários, oviduto, endométrio e miométrio – em todos esses tecidos seus receptores são encontrados (Kirby et al., 1996; Izadyar et al., 1997; 2000). No entanto, é no fígado que o GH tem seu maior poder de atuação, uma vez que é nele que a maior parte dos GHRs estão presentes e, em decorrência disso, a principal produção e liberação de IGF1 (Etherton e Bauman, 1998; Hauser et al., 1990). Entretanto, o mecanismo de resposta do animal ao GH depende da disponibilidade e sensibilização de tais receptores, essenciais para a síntese de IGF1, sendo o estado nutricional do animal um fator determinante nesse processo (Hauser et al., 1990; Lucy, 2011).

Quando um animal está em fase de crescimento ou em balanço energético positivo (BEP) e grande quantidade de GHRs está expressa no fígado, há liberação de GH pela pituitária, os GHRs são ativados e IGF1 é produzido e liberado na circulação sanguínea (Lucy, 2011). Assim, juntos, GH e IGF1 promovem o crescimento e/ou aumento da atividade metabólica celular em quase todos os tecidos. Nessas condições, diz-se que o eixo somatotrófico está “acoplado” (Lucy, 2011) (Figura 1).

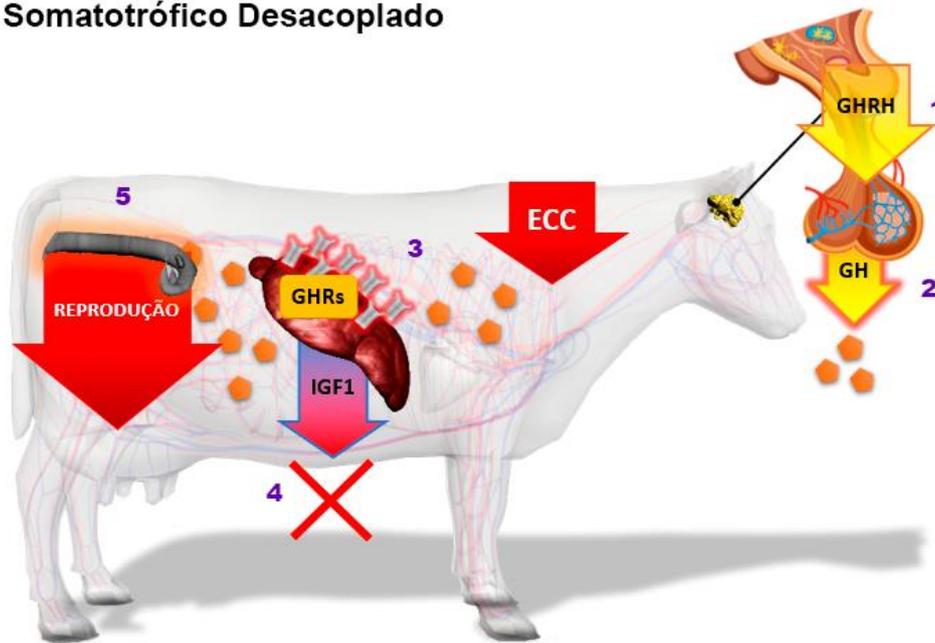
## Eixo Somatotrófico Acoplado



**Figura 1.** Esquemática do Eixo Somatotrófico Acoplado e sua cadeia de mecanismos fisiológicos diretos e indiretos. Legenda: GHRH: Hormônio liberador de hormônio de crescimento; GH: Hormônio de crescimento; Corpo: Organismo animal como um todo; GHRs: Receptores do hormônio de crescimento; IGF1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; IGFRs: Receptores do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; *Feedback* negativo: mecanismo do *feedback* negativo acarretado pelo IGF1; Números verdes: Sequência de mecanismos via ação direta do GH; Números roxos: Sequência de mecanismos via ação indireta do GH. Fonte: Autor, 2019.

Contudo, quando em balanço energético negativo (BEN), este eixo “desacopla-se” e há a diminuição ou parada da produção da IGF1 devido à não expressão e ativação de GHRs e GHBP's pelo fígado (Lucy, 2011). Com isso, o *feedback* negativo sobre a síntese e liberação do GH não ocorre, elevando as concentrações de GH sanguíneo sem a produção e liberação de IGF1, que se mantém baixas (Lucy, 2011). Esse mecanismo, muito comum em animais no período pós-parto, principalmente aqueles ligados à produção leiteira, está associado ao detrimento da função reprodutiva, acabando por inviabilizá-la (Lucy, 2001; Lucy, 2011) (Figura 2).

## Eixo Somatotrófico Desacoplado



**Figura 2.** Esquemática do Eixo Somatotrófico Desacoplado e sua cadeia de mecanismos. Legenda: GHRH: Hormônio liberador de hormônio de crescimento; GH: Hormônio de crescimento; ECC: Escore de condição corporal; GHRs: Receptores do hormônio de crescimento; IGF1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; Reprodução: Influência negativa sobre fatores reprodutivos; Números roxos: Sequência de mecanismos. Fonte: Autor, 2019.

### 1.4.2 Fatores de crescimento semelhante a insulina tipos 1 e 2 (IGF1 e IGF2)

Fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) são importantes hormônios relacionados à insulina, e possuem funções e estruturas muito similares (Lucy, 2011). Estruturalmente, o IGF1 se difere do IGF2 pelo número de aminoácidos – 70 para o tipo 1 e 67 para o tipo 2, mas o IGF1 acaba por ter função primária em relação ao seu semelhante (Humbel, 1990).

A síntese e a secreção de IGF1 são totalmente GH-dependentes, sendo este considerado um hormônio tanto endócrino quanto autócrino/parácrino (Gluckman et al., 1987). Isso se deve ao fato de o hormônio poder tanto ser liberado na circulação, indo até os tecidos-alvo promover ação endócrina, como também ser gerado nos próprios tecidos-alvo via ligação de GHRs (Gluckman et al., 1987).

Há órgãos em que ambos os mecanismos de ação estão presentes, como é o caso dos ovários, onde o IGF1 atua sobre a função reprodutiva “*in situ*” e sistemicamente (Lucy, 2011). O IGF1 se liga a receptores específicos (IGFRs)

presentes na superfície celular não só de tecidos reprodutivos, mas como também de todo o organismo dos animais (Spicer e Echternkamp, 1995).

O IGF1 age promovendo crescimento folicular (Gutierrez et al., 2000), aumenta a proliferação de células da granulosa assim como a esteroidogênese – associado às gonadotrofinas (Liu et al., 1998), além de auxiliar no processo de maturação oocitária (Fortune, 2003), aumentar a viabilidade oocitária (Walters et al., 2006) e auxiliar no posterior desenvolvimento embrionário (Velazquez et al., 2009).

#### 1.4.3 Efeitos da rbST sobre a produção leiteira e reprodução

Por possuir ação anabólica sobre células alveolares das glândulas mamárias e estimular a galactopoiese (Peel et al., 1983; Bauman, 1992; Lee et al., 2007), a rbST se popularizou entre os rebanhos bovinos leiteiros visando maximizar a produção de seus animais (Bauman, 1999). Por esse motivo, desde sua descoberta, a rbST passou a ser produzida em larga escala e direcionada à produção animal (Bauman et al., 1985; 1999).

Sobre a lactação, os efeitos da rbST podem ser gerados diretamente, aumentando o metabolismo de distintos tecidos e direcionando maior aporte de nutrientes à glândula mamária, assim como indiretamente por meio da maior síntese e liberação da IGF1 (Etherton e Bauman, 1998). Em média, quando realizado concomitante a um bom manejo, principalmente nutricional, o uso da rbST acresce a produção leiteira de 10 a 15%, podendo variar entre 7 a 41% (Badinga et al., 1985; Bauman, 1992; Etherton e Bauman, 1998).

Assim como na produção leiteira, a rbST possui capacidade de gerar resposta sobre a fisiologia reprodutiva, tanto direta quanto indiretamente. Diretamente, o hormônio age ligando-se aos GHRs existentes na superfície de várias células do trato reprodutivo – como as presentes no endométrio, miométrio, ovários e ovidutos (Kirby et al., 1996), células do cumulus e trofoblóstos embrionários (Izadyar et al., 1997; 2000; Lucy et al. 1993a). Indiretamente, acredita-se que a rbST exerce sua ação ligando-se aos GHRs hepáticos, estimulando a produção e liberação sérica de IGF1 (Gong et al., 1997; Etherton e Bauman, 1998; Baruselli et al., 2019b). Juntamente às gonadotrofinas, o IGF1 age promovendo crescimento folicular ovariano (Lucy,

2000; Gong, 2002; Fortune et al., 2004) e exerce efeito sobre as camadas da granulosa e teca interna estimulando a proliferação celular e esteroidogênese; e por consequência, leva ao melhor recrutamento de GnRH e do pico pré-ovulatório de LH, com maior e melhor sincronia da ovulação (Gong et al., 1997; Fortune et al., 2004; Buratini Jr., 2007; Lonergan et al., 2013; Kaminski et al., 2019). Em função do maior aporte de GHRs ser verificado no fígado, este mecanismo ocupa lugar significativo nas atividades metabólicas e reprodutivas (Hauser et al., 1990; Lucy, 2011).

Além desses, vários outros efeitos benéficos foram demonstrados estar associados ao uso de rbST aplicado à reprodução bovina, sendo eles: aumento do número de folículos recrutados; modificação do momento de emergência e comprimento de ondas foliculares – com surgimento precoce da segunda onda (Kirby et al., 1997a; 1997b; Lucy et al., 1994); maior desenvolvimento folicular e maturação de oócitos; aumento da TP; melhora do desenvolvimento inicial embrionário; melhora da função do CL assim como do reconhecimento materno da gestação (Gong et al., 1991; De La Sota et al., 1993; Figueiredo et al., 1997; Kirby et al., 1997b; Moreira et al., 2001; Thatcher et al., 2001; Hernández-Cerón e Gutierrez-Aguilar, 2013). A elevação de IGF1 também está relacionada à elevação da atividade do transportador de glicose 1 (GLUT1), uma proteína de membrana que promove captação basal de glicose, sendo fundamental para a maturação nas células da granulosa dos oócitos (Zhou, et al. 2000).

Quando aplicada a protocolos de IATF em fêmeas leiteiras, a rbST gera significativo aumento nas TP ao primeiro serviço (Moreira et al., 2000). Segundo Buratini Jr et al. (2000), fêmeas tratadas com rbST apresentaram aumento plasmático do GH sintético com diminuição lenta em 7 a 8 dias, duplicando as concentrações plasmáticas de IGF1 e tendo um aumento de 36% em número de pequenos folículos (5mm) ao início da onda folicular.

Apesar de um maior número de folículos dominantes (FDs) já ter sido mencionado por Jimenez-Krassel et al. (1999), assim como maior TO por Kaminski et al. (2019), grande parte dos estudos não demonstram efeitos sobre grandes folículos (Gong et al., 1991; 1993a; 1993b; Kirby et al., 1997a; 1997b; Lucy et al., 1993a; 1993b; 1994), acreditando-se que a rbST não contribua para gestações gemelares em decorrência à múltiplas ovulações.

Todos esses efeitos estariam ligados à elevação sérica de IGF1 em resposta ao efeito estimulatório da rbST (Gong et al., 1991; Kuehner et al., 1993; Herrler et al., 1994; Etherton e Bauman, 1998; Bartolome et al., 2002; Baruselli et al., 2019b). No entanto, este aumento em resposta a rbST se manifesta apenas em animais em bom estado nutricional, nos quais encontra-se expressivo número de GHRs funcionais no fígado – eixo somatotrófico acoplado (Burton et al., 1994). Sendo assim, a resposta reprodutiva é influenciada diretamente pelo BEP e/ou BEN (Armstrong et al., 2002; Gong, 2002; Lucy et al., 2013).

### **1.5 Considerações do ECC sobre hormônios metabólicos e reprodução**

O impacto do ECC sobre o sucesso reprodutivo já vem sendo demonstrado há tempos, sendo esse, reflexo da gordura armazenada no corpo do animal (Rodenburg, 1992). De acordo com Ferreira (1993), o BEN, que interfere diretamente no ECC, pode ser definido como a diferença entre a energia ingerida e a necessária para a manutenção corporal e produção, sendo a causa mais comum de falhas reprodutivas. Os efeitos do ECC e do balanço energético sobre a fertilidade parecem ser mediados por alterações endócrinas e metabólicas (Ferreira, 1993).

O ECC correlaciona-se positivamente com importantes aspectos reprodutivos no puerpério, como crescimento folicular, concentração de IGF1, pulsos de LH, intervalo entre partos e TP (Selk et al., 1988; Bishop et al., 1994). Estudos demonstram que o ECC e o ganho de peso pós-parto possuem correlação com o porcentual de repetição de prenhez (Rutter e Randel, 1984; Vizcarra et al., 1998). Gottschall et al. (2011) relatou ter alcançado menores TP trabalhando com animais de baixo ECC em relação àqueles de melhor ECC, com resultados de 55%, 47% e 31% para animais com ECC >2,5, igual a 2,5 e <2,5 respectivamente.

Segundo Bishop et al. (1994), fêmeas com maior ECC no pós-parto iniciam atividade cíclica mais precocemente, com maiores níveis de LH e IGF1. Além disso, vacas com melhor ECC demonstram FDs maiores ou iguais a 10mm ao início dos protocolos hormonais, impactando de maneira mais eficiente à hormonioterapia (Ferreira, 1990; Martinez et al., 1999; Amaral et al., 2008).

Todavia, quando em baixo ECC, assim como em BEN, fêmeas bovinas apresentam menor frequência dos pulsos de LH, menor velocidade de crescimento e diâmetro de FD, baixas concentrações séricas de IGF1, glicose e insulina (Bastos et al, 2004). Já foi demonstrado em bovinos de corte que baixas concentrações de IGF1 estão relacionadas ao prolongamento do período pós-parto (Diskin et al., 2003). Randel (1990) afirma que fêmeas no pós-parto em *déficit* energético-proteico prolongam a inércia ovariana em resposta à diminuição da liberação de LH na adenohipófise.

Em virtude do desacoplamento do eixo somatotrófico, no qual os GHRs hepáticos encontram-se desativados (Lucy et al, 2001), vacas com BEN apresentam acentuada redução na produção de IGF1 durante o pós-parto (Fenwick et al., 2008). Deste modo, o *feedback* negativo do IGF1 não ocorre, há aumento das concentrações séricas de GH, com redução ainda mais acentuada das concentrações de IGF1 (Lucy et al., 2001; Fenwick et al., 2008; Lucy, 2011). Este mecanismo é comum em vacas de leite no pós-parto, ocorrendo perda de peso para suportar a produção leiteira, estando associado ao detrimento da função reprodutiva, a ponto de inviabilizá-la (Lucy, 2011; Lucy et al., 2001). Por outro lado, em vacas de corte com severa restrição nutricional, o BEN também é causa de detrimento reprodutivo e prolongado anestro pós-parto (Diskin et al., 2003).

Ao restringir a nutrição de novilhas de corte, Lents et al. (2013) verificaram queda de IGF1 circulante, menores pulsos de LH e diâmetros foliculares, conduzindo à reduzidas TO em virtude da ausência dos picos pré-ovulatórios de E2 e LH. Com isso, os autores obtiveram 44% vs. 70% de TP para as fêmeas com e sem restrição nutricional, respectivamente. Já em animais com dietas voltadas ao ganho de peso (0,9 kg/dia), foi demonstrado aumento de IGF1, insulina e glicose, quando comparado a animais com dietas mais restritas (0,45kg/dia) (Ciccioli et al., 2003).

A influência da nutrição foi também avaliada sobre as variáveis reprodutivas por Sartori et al. (2016), que realizaram experimento no qual vacas não lactantes Nelore e Holandesa foram submetidas a dietas de alta e baixa energia. Os animais tiveram o ciclo estral sincronizado e avaliado via ultrassonografia (US), concluindo os autores que, independentemente da raça, vacas superalimentadas tem melhor desenvolvimento de estruturas ovarianas

que aquelas subalimentadas, com folículos pré-ovulatórios (FPO) de maior diâmetro ( $14,6 \pm 0,3$  vs.  $12,4 \pm 0,3$  mm) e CL com maior volume ( $5,2 \pm 0,3$  vs.  $3,9 \pm 0,3$  cm<sup>3</sup>).

Sendo assim, é necessário considerar que respostas reprodutivas, hormonais e metabólicas sempre serão divergentes entre animais de diferentes perfis nutricionais. A prioridade energética corporal sempre será o metabolismo, o crescimento, e a manutenção de reservas corporais, ficando a reprodução como a última na lista de prioridades (Yavas e Walton, 2000).

### **1.6 Particularidades metabólicas e reprodutivas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***

Além do estado nutricional, é preciso levar em consideração que há outros fatores que influenciam o desempenho reprodutivo, assim como a síntese de hormônios metabólicos. Tem sido demonstrado que, mesmo sob similares condições ambientais e nutricionais, existem substanciais diferenças na função ovariana e circulação hormonal entre fêmeas bovinas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Sartori et al., 2016).

Dentre as principais diferenças existentes, é citado o número de ondas foliculares por ciclo estral, número de folículos recrutados por onda folicular, diâmetros foliculares e de CL. Além disso, as concentrações hormonais também divergem entre as raças, como níveis de E2 e IGF1 (Alvarez et al, 2000; Bastos et al., 2010; Baldrighi et al, 2014; Gimenes et al., 2015; Sales et al., 2015; Sartori et al., 2013; 2016).

Em estudo realizado por Alvarez et al. (2000), foi demonstrada a prevalência de duas ondas foliculares por ciclo estral para vacas Angus e Brahman, e de três ondas foliculares para vacas da raça Senepol. Bastos et al. (2010), no entanto, ao trabalharem com vacas das raças Nelore e Holandesa, encontraram uma prevalência de três ondas foliculares em ambas as raças (80% e 60%, respectivamente). No mesmo estudo foi demonstrado que a duração do ciclo estral foi similar entre as raças (média de 23 dias) (Bastos et al., 2010). Outros autores reportam número menor de ondas foliculares para vacas taurinas, quando compararam *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (Baldrighi et al., 2014).

Em relação ao número de folículos antrais emergentes durante a onda folicular (2 a 5 mm) e tamanhos foliculares, têm sido demonstrado haver diferenças significantes quando comparados *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* entre si (Sartori et al., 2016). Segundo Carvalho et al. (2008), o número de folículos recrutados por onda folicular é maior em fêmeas *Bos taurus indicus* em comparação às *Bos taurus taurus* (33,4±3,2 vs. 25,4±2,5). Baldrighi et al. (2014) relataram menor número de folículos antrais em *Bos taurus taurus* do que em *Bos taurus indicus*, com média de 27,7 e 64,2 respectivamente. Além disso, foi demonstrado maior diâmetro de FPO ( $\varnothing$ FPO) (15,0 mm vs. 13,7 mm) assim como de CL (26,9 mm vs. 22,4 mm) para os animais taurinos (Baldrighi et al., 2014). Bastos et al. (2010) demonstraram média de número de folículos antrais de 42,7 e 19,7,  $\varnothing$ FPO de 13,4 mm e 15,7 mm, e CLs com 4,9 cm<sup>2</sup> e 7,6 cm<sup>2</sup> para fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, respectivamente.

No entanto, ao aferir níveis hormonais entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, os níveis foram superiores para zebuínos, mesmo estes apresentando menores estruturas. Bastos et al. (2010) encontraram maiores concentrações séricas de P4, assim como maior pico pré-ovulatório de E2 e concentração de insulina para *Bos taurus indicus* em relação a *Bos taurus taurus*. Todas estas diferenças estariam ligadas, principalmente, às mais elevadas concentrações plasmáticas de IGF1 e insulina apresentadas por fêmeas *Bos taurus indicus* (Simpson et al., 1994; Alvarez et al., 2000; Sales et al., 2015; Sartori et al., 2013; 2016). Bastos (2012), em seu estudo, relatou ter encontrado maiores concentrações séricas tanto de insulina (9,9 e 3,0  $\mu$ UI/mL) quanto de IGF1 (245,5 e 198,25 ng/mL) em fêmeas *Bos taurus indicus* comparando às *Bos taurus taurus*, respectivamente. Sendo assim, sabendo-se que o maior nível circulante da IGF1 e insulina levam a uma maior proliferação das células da granulosa e produção de E2, considera-se verdadeira a hipótese que de fato a produção de esteroides seja maior em zebuínos (Sartori et al., 2016).

Apesar de já ser relatado que o emprego da rbST melhora o desenvolvimento embrionário em fêmeas *Bos taurus taurus* (Izadyar et al., 1996; Moreira et al., 2001, Hasler et al., 2003; Martins et al., 2012), em *Bos taurus indicus* efeitos benéficos ainda não foram verificados, sugerindo haver

diferenças na resposta deste hormônio (Martins et al., 2012), e a necessidade da novos estudos comparativos.

#### 1.6.1 Dosagem da rbST e mérito genético

A dose ideal para o uso da rbST aplicada à reprodução bovina continua sendo uma incógnita, uma vez que resultados variados foram obtidos pelo emprego de diferentes dosagens em distintos grupos genéticos. Os efeitos da rbST parecem ser dose-dependentes, observando-se o aumento da produção leiteira, por exemplo, de acordo com a dose administrada (Hutton, 1957; Bauman et al., 1985; Eppard et al., 1985; Hartnell et al., 1991).

Estudos avaliaram a curva de dose-resposta à rbST sobre a produção leiteira de vacas *Bos taurus taurus* na raça Holandesa (Hartnell et al., 1991). Doses de 250, 500 e 750 mg foram administradas a cada 14 dias, correspondendo, respectivamente, a doses de 17,8, 35,7, e 53,7 mg/dia, uma vez que o fármaco contempla características de liberação lenta e homogênea. As aplicações foram iniciadas aos 60 dias de lactação. Observou-se aumento de 12,1%, 15,2% e 26,5% na produção leiteira, em função do respectivo aumento das doses.

Em vacas leiteiras cruzadas (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) foi demonstrado que, uma dose menor de rbST que aquela recomendada à *Bos taurus taurus* (500 mg) foi a mais indicada (Cisse et al., 1996; Fontes et al., 1997; Phipps et al., 1997; Azizan et al., 1999). Phipps et al. (1997) verificaram aumento de 1,1; 2,5; e 1,7 kg, da produção leiteira de vacas cruzadas em resposta às doses de 167, 334 e 500 mg de rbST, sinalizando melhor produtividade ao se empregar 334 mg, acarretando aumento de 23,6% de leite, quando comparada a resposta à dosagem de 500 mg. Em outro estudo vacas cruzadas receberam 250 e 500 mg de rbST sem diferença no aumento da produção leiteira ao ser a rbST aumentada de 250 para 500 mg, com 22% de aumento na produção leiteira em ambas as doses (Fontes et al., 1997). Sendo assim, é sugerido que, em vacas cruzadas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, ou de menor mérito leiteiro, menores doses que aquelas empregadas à *Bos taurus taurus* já seriam suficientes para promover melhor resposta na produção leiteira.

Em vista disso, considera-se que tal diferença entre as dosagens seria provavelmente aplicada também à resposta reprodutiva ao rbST, uma vez que esta se dá também por meio da liberação de IGF1, sendo necessárias menores doses às fêmeas de menor mérito leiteiro e ostentando diferentes graus de genética *Bos taurus indicus*. Em estudo realizado com vacas cruzadas Angus, uma dose de 650 mg de rbST foi administrada ao início do protocolo de IATF (CO-Synch+CIDR) (Oosthuizen et al., 2018). Neste estudo, significativa diferença na dosagem plasmática de IGF1 ( $P < 0,05$ ) foi verificada, sendo maior nas vacas tratadas com rbST que nas fêmeas controles ( $372,4 \pm 16,6$  vs.  $193,7 \pm 16,6$  ng/mL, respectivamente). Ao se analisar as TPs, estas foram significativamente menores nas fêmeas tratadas com a rbST em relação às não tratadas (29,9 e 42,5 %) respectivamente. Elevadas concentrações de IGF1 em resposta a dose de 650 mg de rbST podem acarretar efeitos deletérios sobre o ambiente uterino, prejudicando o desenvolvimento embrionário. O excesso de IGF1 já foi correlacionado anteriormente a baixos índices reprodutivos (McCaffery et al., 2000; Webb et al., 2004), necessitando-se estabelecer doses adequadas da rbST e, conseqüentemente, níveis favoráveis de IGF1.

Sendo assim, as diferenças metabólicas e reprodutivas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, de distintos méritos genéticos, necessitam ser consideradas, para que então se estabeleçam quais as melhores doses, momentos e quais são os tipos de aplicações hormonais mais eficientes em pró do melhor desempenho em protocolos reprodutivos visando a IATF.

## **1.7 Objetivo do Trabalho**

O estudo objetivou verificar a eficiência da somatotrofina recombinante bovina em vacas múltiparas de corte *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e cruzadas, de diferentes escores de condição corporal, submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, comparando-a a protocolos convencionais e com a adição da eCG sobre: (1) a taxa de prenhez, (2) diâmetro do folículo dominante e pré-ovulatório e (3) taxa de crescimento e de atresia folicular após a remoção do dispositivo de progesterona.

## CAPITULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico  
Theriogenology)

### **A SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO: EFEITOS SOBRE O FOLÍCULO DOMINANTE E TAXA DE PRENHEZ DE VACAS DE CORTE *BOS TAURUS INDICUS* E *BOS TAURUS TAURUS***

### **THE RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPHIN IN TIMED-ARTIFICIAL INSEMINATION: EFFECTS ON DOMINANT FOLLICLE AND PREGNANCY RATE IN *BOS TAURUS INDICUS* AND *BOS TAURUS TAURUS* BEEF COWS**

#### **RESUMO**

O estudo objetivou verificar a eficiência da somatotrofina recombinante bovina (rbST) sobre a taxa de prenhez (TP, %), diâmetro do folículo dominante ( $\emptyset$ FD, mm) e do pré-ovulatório ( $\emptyset$ FPO, mm), taxa de crescimento folicular (TCF, mm) e de atresia folicular (TAF, mm), após a retirada da progesterona em vacas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram realizados três estudos com o total de 353 vacas multíparas oriundas de três fazendas: Estudo 1 (fazenda 1; n = 150; vacas *Bos taurus indicus*; escore de condição corporal [ECC] 2,5); Estudo 2 (fazenda 2; n = 92; vacas *Bos taurus indicus*; ECC 3,0); Estudo 3 (fazenda 3; n = 111; vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas; ECC 3,5). Em cada estudo, foram constituídos grupos respectivamente como segue: grupo rbST administrada no dia zero (GbSTd0; n = 31, 31 e 40 animais); grupo rbST no dia oito (GbSTd8; n = 31, 31 e 37) e grupo controle (GC; n = 42, 30 e 34). O GbSTd0 recebeu no d0 um dispositivo intravaginal com progesterona (P4, 1,0 g) + benzoato de estradiol (BE, 2,0 mg, IM) + rbST (250 mg, SC); no d8 houve a remoção do dispositivo + D-cloprostenol (PGF $2\alpha$ , 150 mg, IM) + cipionato de estradiol (CE, 0,5 mg, IM); no d10 executou-se a IATF. O GbSTd8 recebeu idêntico protocolo ao GbSTd0, exceto a aplicação da rbST no dia 8. O GC recebeu o mesmo tratamento que GbSTd0, exceto a não-aplicação da rbST. No estudo 1 adicionou-se um grupo

eCG (GeCG; n= 46), o qual recebeu idêntico tratamento ao GC + eCG (300 UI, IM) no d8. Os folículos ovarianos foram avaliados por exame ultrassonográfico (US) em d0, d8 e d10 dos protocolos. Foram calculadas as TP e as TCF e TAF entre d8 a d10 do protocolo. As TPs à IATF resultaram respectivamente em 16,1%; 19,4%; 30,9% e 43,4% nos GbSTd0, GbSTd8, GC e GeCG (estudo 1); 32,2%; 38,7% e 40,0% e 65,0%; 37,8% e 41,1%, nos GbSTd0, GbSTd8, GC (estudos 2 e 3). No estudo 1, a eCG contribuiu para o maior  $\varnothing$ FPO (11,2±1,5 vs. 9,6±0,5 no GbSTd0; 9,9±0,8 no GbSTd8; 10,1±1,3 no GC) (P=0,0001) e maior TCF (2,20±1,03 vs. 0,93±0,50 no GbSTd0; 0,94±0,52 no GbSTd8, 1,17±0,64 no GC) (P<0,0001). No estudo 2 a TCF observada no GbSTd8 foi superior às demais (3,19±1,27 vs. 2,25±0,87 do GbSTd0; e 1,64±0,86 do GC) (P<0,0001). No estudo 3, o GbSTd0 apresentou diferença ao se comparar as TP (P<0,05) e as TCF entre os grupos (3,12±1,15 vs. 2,27±1,38 e 1,60±1,3 para GbSTd0, GbSTd8 e GC respectivamente) (P=0,0001). Concluiu-se que a GeCG resultou em maior eficiência reprodutiva (TCF e  $\varnothing$ FPO) vs. demais grupos, quando em vacas *Bos taurus indicus* com ECC 2,5. A TCF foi maior no GbSTd8 em vacas *Bos taurus indicus* com ECC 3,0. A rbST administrada ao d0 do protocolo incrementou a TP e a TCF em vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas com ECC 3,5. Mais estudos sobre a atuação da rbST nesta área são requeridos.

**Palavras-chave:** Somatotrofina recombinante bovina. *Bos taurus taurus*. *Bos taurus indicus*. Brangus. Dinâmica Folicular. IATF.

## ABSTRACT

The study verified the reproductive efficiency of recombinant bovine somatotrophin (rbST) on pregnancy rate (PR, %), dominant follicle ( $\varnothing$ DF, mm) and preovulatory follicle diameter ( $\varnothing$ POF, mm), follicular growth rate (FGR, mm) and follicular atresia rate (FAR, mm) after progesterone withdrawal in cows submitted to timed-artificial insemination (TAI) protocols. Three studies were conducted in 353 cows from three farms: Study 1 (farm 1; n=150; *Bos taurus indicus* cows; BCS 2.5); Study 2 (farm 2; n=92; *Bos taurus indicus* cows; BCS 3.0); Study 3 (farm 3; n=111; *Bos taurus taurus*; BCS 3.5). In each study the groups were assembled respectively as follows: day zero rbST group (GbSTd0; n=31, 31 and 40 animals), day eight rbST group (GbSTd8; n=31, 31 and 37) and

control group (CG; n=42, 30 and 34). GbSTd0 received on d0 an intravaginal device with P4 (1.0 g) + EB (2.0 mg, IM) + rbST (250 mg, SC); on d8 P4 removal + cloprostenol (150 mg, IM) + EC (0.5 mg, IM); on d10 FTAI was performed. GbSTd8 received the same protocol except rbST, which was administered on d8. The CG received the same treatment as GbSTd0, except for the application of rbST. In study 1 an eCG group (GeCG; n=46) was added which the same treatment to GC + eCG (300 UI, IM) on d8. Ovarian follicles were evaluated by ultrasound examinations (US) on d0, d8 and d10 of the protocols. PR, FGR and FAR from d8 to d10 were evaluated. PR at TAI resulted respectively 16,1; 19.4; 30.9 and 43.4%; 32.2; 38.7 and 40.0% and 65.0; 37.8 and 41.1% in GbSTd0, GbSTd8, GC and GeCG (studies 1, 2 and 3). In study 1, GeCG resulted in the biggest ØPOF (11.2±1.5 vs. 9.6±0.5[GbSTd0]; 9.9±0.8[GbSTd8]; 10.1±1.3[GC]) (P=0.0001) and the highest FGR (2.20±1.03 vs. 0.93±0.50[GbSTd0]; 0.94±0.52[GbSTd8]; 1.17±0.64[GC]) (P<0.0001). In study 2, the FGR in GbSTd8 was higher than the others (3.19±1.27 vs. 2.25±0.87 on GbSTd0; and 1.64±0.86 on CG) (P<0.0001). In study 3, GbSTd0 presented difference when comparing the PR (P<0.05) and the FGR between the groups (3.12±1.15 vs. 2.27±1.38 and 1.60±1.3 for GbSTd0, GbSTd8 and CG, respectively) (P=0.0001). Differences in TAF were not verified. It was concluded that GeCG resulted in higher reproductive efficiency (FGR and ØPOF) than the others, when in *Bos taurus indicus* cows with BCS 2.5. The FGR was the biggest in GbSTd8 in *Bos taurus indicus* cows with BCS 3.0. The rbST administered at d0 of the protocol resulted in the highest PR and FGR in *Bos taurus taurus* and crossbred cows with BCS 3.5.

**Keywords:** Recombinant Bovine Somatotrophin. *Bos taurus taurus*. *Bos taurus indicus*. Brangus. Follicular Dynamics. TAI.

## 1. INTRODUÇÃO

Com os avanços relativos à fisiologia ovariana e à dinâmica folicular [1] os protocolos hormonais que visam a sincronização do estro e da ovulação tiveram significativos incrementos e demandas de modo a aquecer as práticas da inseminação artificial (IA) nos rebanhos bovinos.

Progestágenos (P4) combinados ao estradiol (E2) suprimem o crescimento folicular, com emergência de uma nova onda folicular entre 3 a 4 dias após a aplicação [2,3] e, em conjunto com agentes luteolíticos (PGF2 $\alpha$ ) aplicados à retirada da P4, proporcionam a sincronização do estro e da ovulação [4,5].

Neste contexto, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) é também utilizada para maximizar os resultados em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), especialmente quando aplicados em vacas *Bos taurus indicus* [6,7]. Por apresentar atividade semelhante ao hormônio luteinizante (LH) e ao hormônio folículo estimulante (FSH) [8], a eCG apresenta capacidade de otimizar o crescimento folicular ovariano, resultando em maior diâmetro de corpo lúteo (CL), bem como maiores concentrações de P4, contribuindo para a manutenção gestacional e maior eficiência reprodutiva [7,9]. A eCG, quando aplicada no momento da remoção do implante de P4, proporciona aumento das taxas de ovulação (TO), aumento das taxas de crescimento folicular (TCF) e das taxas de prenhez (TP), principalmente em fêmeas dotadas de baixo escore de condição corporal (ECC) e/ou anestro pós-parto [10,11].

Por sua vez, efeitos benéficos têm sido verificados ao se associar a somatotrofina recombinante bovina (rbST) à reprodução bovina [12,13,14]. A rbST está relacionada à elevação sérica do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) [15,16,17]. Indiretamente, a rbST liga-se aos receptores do hormônio de crescimento (GHRs) hepáticos, estimulando a síntese e a liberação sérica de IGF1 [17,18,19] que, juntamente com as gonadotrofinas hipofisárias, promove crescimento folicular [20,21,22]. Por meio da IGF1, a rbST age sobre as camadas da granulosa e teca interna do folículo, estimulando a proliferação celular, elevando a produção de E2 e, por consequência, promovendo melhor feedback positivo sobre a liberação de GnRH, recrutamento mais eficiente do pico pré-ovulatório de LH e a melhor sincronia da ovulação [9,14,18].

A rbST foi correlacionada positivamente ao aumento do número de folículos recrutados, ao surgimento precoce da segunda onda folicular [13,23], à maior TCF e ao maior crescimento e maturação oocitário. A rbST também foi correlacionada às maiores TP, ao melhor desenvolvimento embrionário, função do CL e ao reconhecimento materno da gestação [24,25]. Kaminski et al. [14] correlacionaram o emprego da rbST administrada ao d0 do protocolo à maior TCF, diâmetro do folículo pré-ovulatório ( $\varnothing$ FPO) e TO.

No entanto, Burton et al. [26] relataram que o aumento de IGF1 em resposta à rbST se manifesta somente em animais com bom ECC. Sendo assim, a resposta à rbST é influenciada diretamente pelo balanço energético positivo (BEP) e/ou negativo (BEN) [27,28,29].

Além disso, concentrações plasmáticas de IGF1 diferem entre os grupos genéticos bovinos [30,31]. Estudos demonstraram que, embora taurinos apresentem maiores estruturas de FPO e CL, são os zebuínos que detêm maiores concentrações hormonais de E2 e IGF1 [32,33].

Em *Bos taurus taurus*, o emprego da rbST já foi correlacionado à melhora do desenvolvimento embrionário por meio das ações do IGF1 [34,35]. No entanto, em *Bos taurus indicus* efeitos benéficos ainda não foram verificados, sugerindo existirem diferenças na resposta ao hormônio [35]. Sendo assim, evidenciam-se entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* diferenças fisiológicas que devem ser consideradas, visando estabelecer momentos e doses que correspondam à maior eficiência reprodutiva.

Inicialmente, a rbST foi desenvolvida visando o aumento da produção de vacas leiteiras de alto mérito genético (*Bos taurus taurus*), nas quais o metabolismo apresenta-se mais acelerado se comparado às vacas de corte [36,37]. Já foi sugerido que, em vacas cruzadas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, doses menores que 500 mg seriam suficientes para promover resposta satisfatória ao hormônio [38,39]. No entanto, doses para sua aplicação em bovinos de corte almejando a melhora da performance reprodutiva não foram ainda estabelecidas, enfatizando-se a redução da eficiência reprodutiva quando dosagens excessivas (650 mg) foram empregadas [40]. Assim, a hipótese do presente estudo é a de que o emprego de meia dose da rbST comercial (250 mg, SC) seja suficiente para acarretar ações de incremento à reprodução.

O presente estudo objetivou verificar a eficiência da rbST sobre os parâmetros reprodutivos – TP, diâmetro do maior folículo, TCF e TAF, de vacas multíparas de corte de diferentes genéticas (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e cruzadas) e ECC, quando submetidas a protocolos de IATF.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 Localização e animais

Foram realizados três estudos conduzidos em três diferentes fazendas comerciais de bovinocultura de corte, com clima subtropical úmido, respectivamente sob as coordenadas, temperatura média e pluviosidade anual como segue: fazenda 1 = 25° 02' 34" S, 52° 40' 49" W; 18,3 °C; 1752 mm; fazenda 2 = 25° 22' 35" S, 52° 07' 45" W; 17,6 °C; 1753 mm; fazenda 3 = 25° 51' 19" S, 52° 31' 47" W; 17,6 °C; 1865 mm. Foram utilizadas trezentas e cinquenta e três vacas multíparas, sendo cada estudo equivalente a uma fazenda (1, n = 150; 2, n = 92; e 3, n = 111 vacas). As fêmeas possuíam média de idade de 4,5 anos, sendo mantidas, em todas as fazendas, em pastagens predominantemente *Cynodon dactylon* e *Brachiaria*, com água e sal mineral *ad libitum*. Em função das diferenças nos ECC, tempo após o parto (dias em aberto) e subespécies entre as fazendas, a pesquisa foi delineada sob três distintos estudos.

Estudo 1: Vacas *Bos taurus indicus* (Nelore), média de 45 dias pós-parto (DPP), ECC entre 2,0 e 2,75.

Estudo 2: Vacas *Bos taurus indicus* (Nelore), média de 60 DPP, ECC entre 2,75 e 3,5.

Estudo 3: Vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas (Aberdeen e Red Angus e Brangus), média de 60 DPP, ECC entre 3,0 e 4,0.

Os animais tiveram os ECC classificados ao início dos estudos (d0) sendo: ECC 1,0 = caquética/muito magra; 2,0 = magra; 3,0 = médio/ideal; 4,0 = gorda; e 5,0 = obesa [41]. O estado sanitário das fazendas era monitorado rotineiramente, com os protocolos vacinais atualizados, livres de brucelose e tuberculose bovina.

## 2.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídas apenas fêmeas bovinas sanitariamente saudáveis e aptas à reprodução, com ECC dentro daqueles determinados para cada estudo.

## 2.3 Critérios de Exclusão

Vacas com ECC inferior ou superior àqueles estabelecidos para cada estudo não foram incluídas nos estudos, assim como fêmeas que apresentaram problemas reprodutivos: metrite, endometrite, involução uterina retardada, cistos ovarianos, ovários atróficos, entre outros. Vacas com folículos  $\leq 4,0$  mm e sem CL foram consideradas em anestro [42], e não foram incluídas no experimento. Vacas que apresentaram folículos entre 5,0 e 6,0 mm no d0, mas que não demonstraram folículos maiores ao d8, igualmente foram excluídas do experimento.

## 2.4 Grupos e Protocolos Experimentais

Em cada estudo, os animais foram aleatoriamente divididos nos grupos (estudos 1, 2 e 3, respectivamente): Grupo rbST ao dia zero (GbSTd0; n = 31, 31 e 40 animais), grupo rbST ao dia oito (GbSTd8; n = 31, 31 e 37 animais) e Grupo Controle (GC; n = 42, 30 e 34 animais). O GbSTd0 recebeu no d0 do protocolo, um dispositivo intravaginal com P4 (1,0 g) + BE (2,0 mg, IM) + rbST (250 mg, SC); no d8 o dispositivo foi retirado e aplicado D-cloprostenol (150 mg, IM) + CE (0,5 mg, IM); no d10 foi efetuada a IATF. O GbSTd8 recebeu idêntico protocolo, exceto a rbST, administrada ao d8. O GC recebeu o mesmo tratamento que GbSTd0, exceto a não-aplicação da rbST. No estudo 1 foi adicionado ainda o Grupo eCG (GeCG, n = 46), o qual recebeu idêntico tratamento ao GC, exceto a administração de 300UI de eCG ao d8 do protocolo.

Para a aplicação da rbST o conteúdo original (1,2 mL, contendo 500 mg de rbST; Lactotropin Injetável™, Elanco™, Georgia, EUA) foi dividido em duas partes iguais (2 x 0,6 mL, contendo 250 mg de rbST cada) em seringas estéreis transparentes. O hormônio foi administrado por via subcutânea (SC) na região da prega caudal, com desinfecção prévia do local.

Para as inseminações utilizou-se sêmen congelado comercial, com qualidade e fertilidade devidamente comprovadas.

O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado ao d45 via ultrassonografia transretal (SonosCape® A6v, transdutor retilíneo L531v 3,5 a 7,5 MHz, China).

Na Figura 1 encontram-se os diagramas dos protocolos utilizados:

### GbSTd0

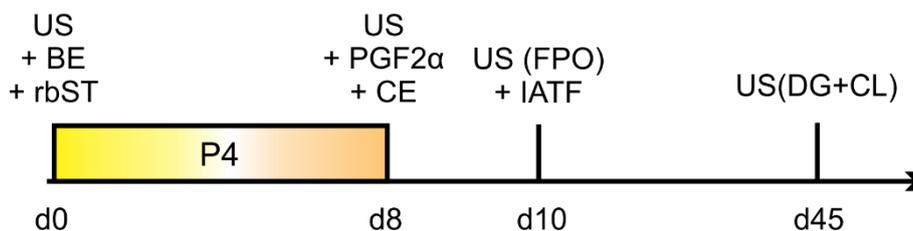


Diagrama do Grupo somatotrofina recombinante bovina administrada nas vacas ao dia zero do protocolo (GbSTd0).

### GbSTd8

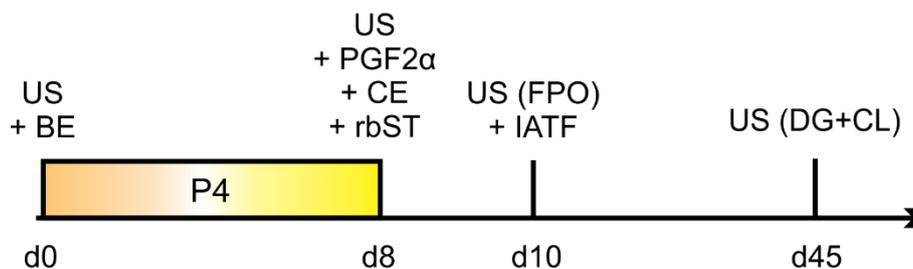


Diagrama do Grupo somatotrofina recombinante bovina administrada nas vacas ao dia oito do protocolo (GbSTd8).

### GC

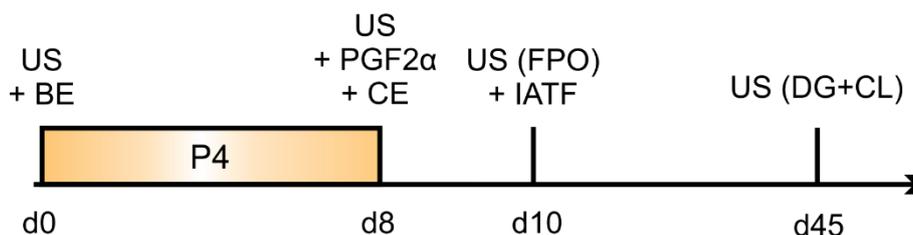


Diagrama do Grupo controle de vacas (GC).

## GeCG

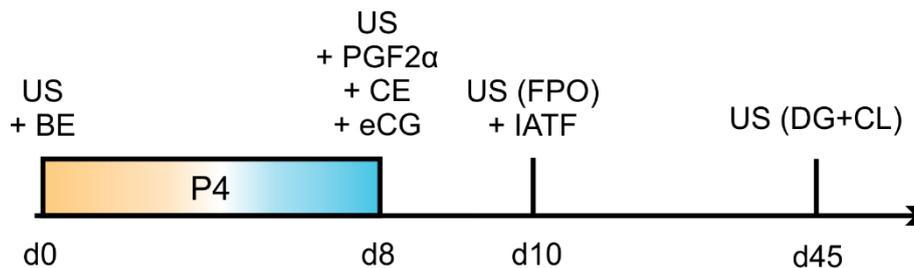


Diagrama do Grupo gonadotrofina coriônica equina administrada nas vacas ao dia oito do protocolo (GeCG).

**Figura 1.** Diagramas dos protocolos hormonais administrados em vacas múltíparas *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e cruzadas com vistas à inseminação artificial em tempo fixo, com monitoramento ovariano por exames de ultrassonografia. Legenda: US: Ultrassonografia transretal; P4: Dispositivo intravaginal com progesterona de liberação controlada (1,0 g de P4, Cronipres<sup>®</sup> monodose, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil); BE: Benzoato de estradiol (2,0 mg IM, Cronibest<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil); rbST: Somatotrofina recombinante bovina (250 mg, Lactotropin Injetável<sup>™</sup>, Elanco<sup>™</sup>, Georgia, EUA); PGF2 $\alpha$ : D-Cloprostenol (150 mg IM, Croniben<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil); CE: Cipionato de estradiol (0,5 mg IM, Croni-CIP<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil); eCG: Gonadotrofina coriônica equina (300 UI IM, Ecegon<sup>®</sup>, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil); FPO: Folículo pré-ovulatório; IATF: Inseminação artificial em tempo fixo; DG: Diagnóstico de gestação; CL: Corpo lúteo.

### 2.5 Exame Ultrassonográfico e Dinâmica Folicular

Os ovários foram avaliados por ultrassonografia transretal (SonosCape<sup>®</sup> A6v, transdutor retilíneo L531v 3,5 a 7,5 MHz, China), em d0, d8 e d10 dos protocolos. Mensurou-se o diâmetro ( $\varnothing$ ; mm) do folículo dominante (FD) e do FPO, considerando-se: diâmetro maior ( $>\varnothing$ ) + diâmetro menor ( $<\varnothing$ )  $\div$  2 [24]. A taxa de crescimento folicular (TCF) e a taxa de atresia folicular (TAF) foram calculadas por meio da diferença dos diâmetros de FD entre d8 e d10 dos protocolos ( $\varnothing$ FPO ao d10 menos o  $\varnothing$ FD ao d8; mm) [43,44].

Foram considerados folículos em crescimento aqueles que apresentaram aumento maior que 5% no intervalo entre d8 a d10, folículos atrésicos os que apresentaram decréscimo mais acentuado que 5%, ou que não evidenciaram diferença de crescimento maior que 5% entre d8 a d10.

### 2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do *software* IBM SPSS Statistics, versão 24 para Windows, Chicago, EUA. O teste de Levene foi

utilizado para avaliar a homogeneidade de variância, premissa fundamental para o posterior emprego da ANOVA, seguido do teste de Tukey ou Bonferroni, de acordo com a homocedasticidade. As análises de variância incluíram o fator grupo nos tempos d0, d8 e d10 do protocolo, para comparar as médias de FD, FPO, TCF e TAF. A TP e o percentual de animais com crescimento folicular (CF) e /ou atresia folicular (AF) entre os grupos foram comparados por meio do teste de Qui-quadrado com correção para amostras não-ponderadas, visando resultado mais fidedigno entre os grupos com diferentes quantidades de animais. A correlação entre as variáveis foi verificada utilizando o teste de Pearson. Para todas as análises estatísticas foi estabelecida significância ao nível de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados dados referentes às TP de cada estudo *per se*.

**Tabela 1** - Taxa de prenhez (TP) nos grupos somatotrofina recombinante bovina (rbST) administrada ao dia zero (GbSTd0), ao dia oito (GbSTd8), grupo eCG (GeCG) e grupo controle (GC) de vacas *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e cruzadas submetidas a protocolos de IATF. Estudos 1, 2 e 3.

Estudos	Taxa de prenhez nos grupos n (%)			
	GbSTd0	GbSTd8	GeCG	GC
1	5/31(16,1) <sup>b</sup>	6/31(19,4) <sup>b</sup>	20/46(43,4) <sup>a</sup>	13/42(30,9) <sup>ab</sup>
2	10/31(32,2)	12/31(38,7)	-	12/30(40,0)
3	26/40(65,0) <sup>a</sup>	14/37(37,8) <sup>b</sup>	-	14/34(41,1) <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam significância ao nível de  $P < 0,05$  ao teste Qui-quadrado.

Resultados discrepantes das TP foram verificadas nos grupos que receberam a rbST vs. o GeCG (Tabela 1). No estudo 1 foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) em prol do grupo GeCG vs. os grupos rbST. No estudo 2 não foram observadas diferenças entre as TP dos grupos ( $P > 0,05$ ). No estudo 3, o GbSTd0 apresentou maior TP ( $P < 0,05$ ) comparativamente aos demais. Os resultados estão relacionados às diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os ECC das vacas de cada estudo (médias e medianas) sendo:  $2,4 \pm 0,2$  e  $2,5$  (Estudo 1);  $3,2 \pm 0,4$  e  $3,0$  (Estudo 2); e  $3,5 \pm 0,4$  e  $3,5$  (Estudo 3).

Ao teste de correlação de Pearson, as variáveis ECC, raça e DPP apresentaram correlação positiva sobre a TP em todos os estudos e grupos, sendo: ECC vs. TP ( $P < 0,0001$ ); raça vs. TP ( $P = 0,0023$ ); e DPP vs. TP ( $P = 0,0002$ ).

O impacto do ECC sobre a performance reprodutiva foi demonstrado por Gottschall et al. [45] quando obtiveram TP de 55%, 47% e 31% ao trabalharem com animais com ECC  $> 2,5$ , igual a 2,5 e  $< 2,5$  respectivamente, corroborando às diferenças entre as TP verificadas no presente estudo.

Assim, por se tratarem de animais com diferentes ECC, raças e DPP entre os estudos (fazendas), os resultados serão apresentados e discutidos separadamente, na sequência dos estudos 1, 2 e 3, conforme os grupos. As influências de cada um destes fatores serão igualmente discutidas dentro de cada estudo.

### 3.1 Estudo 1

Na Tabela 2 encontram-se dados dos animais do estudo 1 que apresentaram crescimento dos FDs entre d8 a d10 dos protocolos.

**Tabela 2** - Diâmetros do maior folículo ( $\varnothing > F$ ), folículo dominante ( $\varnothing FD$ ) e do folículo pré-ovulatório ( $\varnothing FPO$ ), taxa de crescimento folicular (TCF) e taxa de prenhez (TP) de vacas *Bos taurus indicus* submetidas a diferentes protocolos e que apresentaram crescimento folicular entre d8 a d10. Estudo 1.

Grupos	Vacas em CF d8 a d10 n (%)	$\varnothing > F$ d0 (mm)	$\varnothing FD$ d8 (mm)	$\varnothing FPO$ d10 (mm)	TCF d8 a 10 (mm)	$\varnothing FPO$ vacas prenhes (mm)	$\varnothing FPO$ vacas vazias (mm)	TP n (%)
GbSTd0	12/31 (38,7) <sup>c</sup>	9,6 $\pm$ 1,1	8,6 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,93 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	9,9 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	9,4 $\pm$ 0,3	5/31 (16,1) <sup>b</sup>
GbSTd8	18/31 (58,0) <sup>bc</sup>	9,5 $\pm$ 0,9	8,9 $\pm$ 0,8	9,9 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	10,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	9,6 $\pm$ 0,7	6/31 (19,4) <sup>b</sup>
GeCG	42/46 (91,3) <sup>a</sup>	9,6 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 1,1	11,2 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	12,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	10,3 $\pm$ 1,5	20/46 (43,4) <sup>a</sup>
GC	29/42 (69,0) <sup>b</sup>	9,4 $\pm$ 1,7	8,9 $\pm$ 1,4	10,1 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	1,17 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	11,4 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>	9,3 $\pm$ 0,9	13/42 (30,9) <sup>ab</sup>
P-valor	<0,05	0,9712	0,8507	0,0001	<0,0001	0,0002	0,0616	<0,05

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ao teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) (Vacas em CF e TP) e aos testes Bonferroni ou Tukey (demais variáveis, P-valor pelo teste ANOVA). CF = crescimento folicular; d = dia.

Observou-se que 91,3% dos animais do GeCG e mais que 50,0% das vacas GC e GbSTd8 apresentaram FDs em crescimento entre d8 e d10 do protocolo, em comparação com o GbSTd0. Ao início do estudo foram verificados, em todos os grupos, folículos com reduzidas dimensões (<10 mm), menores até que as relatadas por Ferreira [46]. As vacas deste estudo (1) encontravam-se na fase de puerpério de 45 dias (média) e, adicionalmente, apresentavam reduzido ECC devido ao BEN em decorrência à época de partos, onde houve escassez de pastagens. Tais fatores, provavelmente, exerceram interferência adversa sobre a atividade cíclica ovariana pós-parto e sobre o crescimento folicular desses animais (Tabela 2) [47,48]. Animais em BEN no pós-parto, associado ao baixo ECC, apresentam menor frequência de pulsos de LH, menor velocidade de CF e menor  $\emptyset$ FD, além de reduzidas concentrações séricas de IGF1, glicose e insulina [49]. Quando em baixo ECC, as vacas demandam de 60 a 120 dias para que a primeira ovulação ocorra [50]. Segundo Williams [51], este prolongamento do período pós-parto, além de ser influenciado pela nutrição e pelo ECC, também é reflexo da presença do bezerro ao pé, que interfere no restabelecimento dos estoques do LH, gerando baixas TP e anestro. Além disso, a reduzida concentração circulante de LH até o 45º dia pós-parto pode ser ocasionada pela deficiência no número de receptores de GnRH na hipófise anterior [52].

Por sua vez, vacas portando folículos maiores ou iguais a 10 mm ao início do protocolo hormonal, viabilizam respostas mais eficientes à hormonioterapia, desde que sob ECC adequado [53,54]. Nos animais em boas condições corporais, os estoques de LH são restabelecidos cerca de 15 e 30 dias após o parto [55], ocorrendo a primeira ovulação geralmente entre 27 e 37 dias após o parto [50]. Maiores TP foram verificadas em vacas com elevado ECC aos 56 dias pós-parto, quando comparadas àquelas com baixo ECC [56]. Silveira et al. [57] ao empregarem eCG em vacas no puerpério recente (35 e 40 dias) e mais tardiamente (a partir de 45 dias pós-parto), obtiveram TP de 37,9% e 51,7% respectivamente. No presente estudo o GeCG ratificou em parte aos achados dos autores supracitados, com o percentual de TP de 43,4%.

A não-responsividade ovariana demonstrou-se mais elevada nas vacas que receberam a rbST, sobretudo, dentro do GbSTd0, o qual apresentou o

menor porcentual de fêmeas com folículos em crescimento ( $P < 0,05$ ). Tal fato, possivelmente, foi gerado pelas reduzidas concentrações de IGF1 circulantes, estando relacionadas ao prolongado intervalo pós-parto que ocorre em vacas de corte [58].

Diferenças entre os ØFD ao d8 não foram verificadas entre os tratamentos (Tabela 2). Observou-se, contudo, diferença ( $P < 0,05$ ) do ØFPO no GeCG (11,2 mm) em relação aos demais grupos, evidenciando-se também maior TCF entre d8 a d10 (2,20 mm). O emprego da eCG à remoção do implante de P4 (d8) acarreta aumento das TO e TP, principalmente em vacas com baixo ECC e/ou anestro pós-parto [10,11], corroborando ao melhor desempenho do GeCG (Tabela 2). É possível que as TO e TP estejam relacionadas ao maior ØFPO e TCF verificadas no GeCG, com mais eficiente responsividade hormonal e liberação do pico pré-ovulatório de LH. Folículos com maiores dimensões detêm maior concentração intrafolicular de E2, acarretando maior liberação de GnRH e LH, favorecendo a sincronia da ovulação [42,59]. Além disso, o maior ØFPO correlaciona-se positivamente com a TP, pelo aumento da quantidade de receptores e da responsividade ao LH [60], o qual acarreta aumento do diâmetro folicular e TO [61].

Nos demais grupos, como os FPOs encontravam-se menores, a capacidade de ovulação ficou reduzida, culminando com as baixas TP verificadas (Tabela 2). Folículos com menor diâmetro no momento da IATF estão ainda imaturos e menos férteis, resultando em menores TP [59,62]. De acordo com Schams e Berisha [63], folículos bovinos de 5 a 7 mm de diâmetro possuem menos que 0,5 ng/mL de E2 intrafolicular, folículos com 8 a 10 mm possuem 0,5 a 5 ng/mL, de 10 a 12 mm possuem 5 a 20 ng/mL, de 13 a 14 mm são verificados 20 a 180 ng/mL, e aqueles folículos maiores que 14 mm detêm valores superiores a 180 ng/mL. Folículos medindo 8 a 10 mm adquirem a capacidade de resposta ao pico pré-ovulatório do LH com ovulação [64], muito embora folículos de menor diâmetro possam ovular e formar CL de menor peso e tamanho, com menor produção de P4 e capacidade de manter gestação [64,65].

Por outro lado, nos grupos que receberam a rbST foram observados menores valores de ØFPO, sobretudo no GbSTd0, sem, no entanto, apresentar diferença estatística. As respectivas TCF e TP foram menores ( $P < 0,05$ ) em relação ao GeCG (Tabela 2). Esperava-se que a rbST administrada no d0 ou d8

acarretasse a maximização das TCF e TP, assim como nos diâmetros médios de FD e FPO, devido aos estímulos à produção de IGF1 e E2 intrafolicular [66,67]. No entanto, este efeito não foi verificado.

A ação da rbST sobre o sistema reprodutivo se dá principalmente por meio do eixo somatotrófico [19]. A rbST liga-se aos GHRs hepáticos [68] estimulando a produção e a liberação sérica de IGF1 [19]. O IGF1, juntamente com as gonadotrofinas, irá promover o crescimento folicular [22], elevando a produção de E2, agindo sobre as camadas da granulosa e da teca interna do folículo, levando ao recrutamento mais eficiente de LH e à melhor sincronia da ovulação [9,67]. No entanto, para que isso ocorra, o eixo somatotrófico necessita estar acoplado, ou seja, esse mecanismo de resposta ao GH sintético depende da disponibilidade e sensibilização dos GHRs [69], sendo influenciado diretamente pelo BEP ou BEN [28,29,70]. Além disso, o IGF1 atua como regulador endócrino do GH por meio do *feedback* negativo. Ou seja, quanto mais elevadas forem as concentrações de IGF1, menor será a produção e a liberação de GH pela adenohipófise, sendo o contrário também verdadeiro [71,72].

É provável que quase a totalidade dos animais do estudo 1 apresentasse a relação GH:IGF1 alterada em virtude do baixo ECC ( $2,4 \pm 0,2$  e  $2,5$ , média e mediana) e do BEN [27,29]. Conseqüentemente, acredita-se que o eixo somatotrófico encontrava-se “desacoplado”, acarretando queda na síntese de IGF1, não ocorrendo o *feedback* negativo sobre o GH, aumentando os níveis séricos de GH [70,73]. Este mecanismo é comumente observado nos animais em período pós-parto (sobretudo leiteiros), redundando no detrimento das funções reprodutivas [70]. Bossis et al. [74] demonstraram este mecanismo ao induzir nutricionalmente o anestro em novilhas de corte, onde os níveis do GH aumentaram durante dois ciclos reprodutivos consecutivos, antes das fêmeas entrarem em anestro. Os mesmos autores demonstraram que os níveis de IGF1 encontravam-se reduzidos, com os GHRs hepáticos não-responsivos ao GH em virtude da subnutrição.

É possível que uma quantidade ainda maior de GH tenha sido induzida pelo tratamento com rbST nas vacas dos GbSTd0 e GbSTd8, que sem ou insuficiente produção de IGF1 em resposta, tenha afetado drasticamente o desempenho reprodutivo. Reduzidos níveis de IGF1 combinados a elevados níveis de GH estão diretamente associados ao comprometimento das funções

reprodutivas [70]. Há, portanto, consistência dessas afirmativas com a baixa eficiência reprodutiva verificada nos grupos rbST, sobretudo em GbSTd0 (Tabela 2).

Outro aspecto a ser discutido no presente estudo é o de que as vacas tratadas com a rbST possivelmente tenham sofrido diferentes graus de lipólise, agravando ainda mais o BEN e o baixo ECC, impactando na não-responsividade ou no não-recrutamento do pico pré-ovulatório do LH. Corroborando a este conceito, Butler et al. [68] e Muller et al. [75] relatam que níveis elevados do GH estimulam a lipólise em detrimento da função reprodutiva. A elevada síntese de GH pode estar associada ao bloqueio da síntese de GnRH hipotalâmico [76], semelhantemente ao que ocorre quando reduzidos níveis de IGF1 e insulina conduzem à insuficiente produção de E2 pelo FPO, inexistindo o pico pré-ovulatório do LH e a ovulação [77]. Reduzidas concentrações de IGF1, aliadas à elevadas de GH, provocam falha na ovulação [42,74]. Isso fundamenta o fato de grande parte das vacas de tais grupos terem apresentado estruturas menores nos ovários, baixas TCF, assim como reduzidas TP. Em todos os grupos do estudo 1, foi observada correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre TP e ECC; entre  $\emptyset$ FPO e ECC, e  $\emptyset$ FPO e TP.

Os dados referentes às vacas que apresentaram folículos em atresia entre d8 a d10 encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3** - Diâmetros do maior folículo ( $\emptyset > F$ ), folículo dominante ( $\emptyset > FD$ ) e folículo pré-ovulatório ( $\emptyset > FPO$ ) e taxa de atresia folicular (TAF) de vacas *Bos taurus indicus* submetidas a diferentes protocolos e que apresentaram atresia folicular entre d8 a d10. Estudo 1.

Grupos	Vacas com atresia folicular d8 a d10 n (%)	$\emptyset > F$ d0 (mm)	$\emptyset > FD$ d8 (mm)	$\emptyset > FPO$ d10 (mm)	TAF d8 a d10 (mm)
GbSTd0	19/31 (61,3) <sup>a</sup>	9,1±0,8	8,2±0,4 <sup>b</sup>	7,0±0,6 <sup>b</sup>	-1,16±0,50
GbSTd8	13/31 (42,0) <sup>ab</sup>	9,0±1,3	8,8±0,7 <sup>ab</sup>	7,9±0,9 <sup>a</sup>	-0,87±0,76
GeCG	4/46 (8,7) <sup>c</sup>	8,7±0,7	9,3±0,5 <sup>a</sup>	8,8±0,7 <sup>a</sup>	-0,51±0,46
GC	13/42 (30,9) <sup>b</sup>	9,2±1,6	8,8±1,1 <sup>ab</sup>	8,1±1,0 <sup>a</sup>	-0,63±0,56
P-valor	<0,05	0,9189	0,0203	0,0007	0,0592

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ao teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) (Vacas em AF) e aos testes Bonferroni ou Tukey (demais variáveis, P-valor pelo teste ANOVA). AF = atresia folicular; d = dia.

Os animais dos grupos rbST evidenciaram maiores percentuais de TAF entre d8 a d10 do protocolo ao se comparar ao GeCG (Tabela 3) ( $P < 0,05$ ). Os dados sustentam que as vacas com baixo ECC tratadas com rbST, especialmente ao d0, manifestaram aumento de GH sérico, desequilibrando a relação GH:IGF1. Nestas condições, provavelmente houve bloqueio da liberação de GnRH [76], com produção insuficiente de E2 pelo FPO, falha no pico pré-ovulatório de LH e na ovulação [77]. Isso ficou evidente à observação das dimensões dos ØFPO, evidenciando o GbSTd0 o valor mais negativo entre os grupos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3).

Segundo Gimenes et al. [78], a capacidade de resposta do FD ao indutor de ovulação em um protocolo de IATF depende das dimensões do FD à aplicação, originando razões pelas quais os resultados de TP variam tanto entre os protocolos. Considerando que a maior parte dos animais do GbSTd0 e grande parte de GbSTd8 apresentaram folículos em atresia, e levando em consideração as dimensões dos FPO, concluiu-se que parte considerável dos animais destes grupos portavam FPO reduzidos para exercer resposta adequada ao estímulo hormonal. Assim, considerável porcentual de animais destes grupos manifestou quadro de atresia folicular (61,3% e 42,0% para GbSTd0 e GbSTd8, respectivamente), impactando em reduzidas TP (Tabela 1). Ao trabalharem com animais *Bos taurus indicus*, Carvalho et al. [79] verificaram elevado porcentual de não-ovulação em função de que os FPO se encontravam ainda imaturos ao final do protocolo. Além disso, a grande quantidade de FPO pequenos acarretou considerável porcentual de falhas e atrasos nas ovulações, assim como menor capacidade esteroidogênica.

Estudos do emprego da rbST em bovinos de corte direcionados à IATF são escassos. Martins et al. [35] não verificaram efeitos benéficos sobre o desempenho reprodutivo de vacas *Bos taurus indicus* (Nelore), mas sim ao trabalharem com vacas *Bos taurus taurus* (Brangus e Holandesa Preta e Branca). Deste modo, é possível deduzir que, entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* existam diferenças fisiológicas a serem consideradas, visando estabelecer doses, momentos e modo de aplicação ideais ao uso da rbST em prol de sua eficiência nos protocolos de IATF.

Deve-se considerar que os efeitos da rbST podem ser influenciados por diversas variáveis, relacionadas ao BEN, ao ECC, aspectos genéticos, dentre

outras [19,70], à semelhança do ocorrido no estudo 1, no qual significantes correlações entre as TP e o ECC, entre  $\varnothing$ FPO e ECC, e  $\varnothing$ FPO e TP ( $P < 0,05$ ) foram constatadas.

### 3.2 Estudo 2

Na Tabela 4 são verificados os dados referentes aos animais do estudo 2 que apresentaram crescimento em seus FDs no intervalo entre d8 a d10 do protocolo.

**Tabela 4** - Diâmetros do maior folículo ( $\varnothing > F$ ), folículo dominante ( $\varnothing$ FD) e do folículo pré-ovulatório ( $\varnothing$ FPO), taxa de crescimento folicular (TCF) e taxa de prenhez (TP) de vacas *Bos taurus indicus* submetidas a diferentes protocolos e que apresentaram crescimento folicular entre d8 a d10. Estudo 2.

Grupos	Vacas com TCF d8 a d10 n (%)	$\varnothing > F$ d0 (mm)	$\varnothing$ FD d8 (mm)	$\varnothing$ FPO d10 (mm)	TCF d8 a d10 (mm)	$\varnothing$ FPO prenhes (mm)	$\varnothing$ FPO vazias (mm)	TP n (%)
GbSTd0	29/31 (93,5) <sup>ab</sup>	10,1±1,6	9,9±1,2	12,2±1,2	2,25±0,87 <sup>b</sup>	12,3±1,4 <sup>b</sup>	12,1±1,2	10/31 (32,2)
GbSTd8	31/31 (100,0) <sup>a</sup>	10,6±1,9	9,8±1,6	13,0±1,6	3,19±1,27 <sup>a</sup>	13,6±1,1 <sup>a</sup>	12,6±1,8	12/31 (38,7)
GC	25/30 (83,3) <sup>b</sup>	9,9±2,6	10,6±0,9	12,2±1,2	1,64±0,86 <sup>b</sup>	12,6±1,2 <sup>ab</sup>	11,9±1,0	12/30 (40,0)
P-valor	<0,05	0,4297	0,0751	0,0596	<0,0001	0,0379	0,4596	>0,05

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ao teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) (Vacas em CF e TP) e aos testes Bonferroni ou Tukey (demais variáveis, P-valor pelo teste ANOVA). CF = crescimento folicular; d = dia.

As vacas inclusas neste estudo encontravam-se com o ECC dentro dos padrões requeridos à boa performance reprodutiva (ECC = 3,2±0,4 e 3,0, média e mediana). Contudo, as TP não se mostraram satisfatórias, mesmo para os padrões de protocolos tradicionais da IATF, uma vez que o GC atingiu 40,0% tão somente.

Vacas de corte e vacas de alta produção leiteira possuem metabolismos diferenciados [36]. Enquanto a vaca leiteira direciona suas energias para a produção leiteira (necessidade de grande ingestão de matéria seca e consequente elevada metabolização hepática), vacas de corte mobilizam nutrientes apenas para amamentação do bezerro (menor produção, comparada à leiteira), não havendo a mesma exigência e metabolização por parte do fígado [37,80]. Tal fato acarreta menor quantidade sérica de hormônios esteroides às

vacas leiteiras [37,80]. Vacas sujeitas à elevadas ingestões de matéria seca possuem maior metabolização de hormônios (E2 e P4) pelo maior fluxo sanguíneo hepático [37]. É possível que, com a rbST, as condições de metabolismo sejam similares, uma vez que a principal atuação da somatotrofina é realizada diretamente no fígado [81]. A rbST comercial (500 mg, SC) foi originalmente desenvolvida para promover o aumento da produção de vacas leiteiras de alto mérito genético, via aumento de IGF1, o qual eleva o fluxo sanguíneo e estimula a síntese de tecido mamário [81].

Doses menores que 500 mg de rbST foram relacionadas à melhor resposta em vacas de menor mérito genético para leite [39]. Os autores do presente estudo propuseram-se a empregar meia dose de rbST (250 mg), propondo menores dosagem para os próximos estudos (125 mg), uma vez que foram comprovadas diferenças fisiológicas considerando-se vacas de corte indicas e taurinas [33]. A quantidade de folículos recrutados por onda folicular é maior em fêmeas *Bos taurus indicus* quando comparadas a *Bos taurus taurus* [32,82]. Estas diferenças estariam ligadas, principalmente, às mais elevadas concentrações plasmáticas de IGF1 e insulina observadas em vacas *Bos taurus indicus* [33,83,84]. Maiores concentrações séricas de insulina, GH e IGF1 foram determinadas em vacas *Bos taurus indicus* comparadas às *Bos taurus taurus* [31,85].

No entanto, há relatos de que elevadas concentrações de IGF1 possam resultar em prejuízo à reprodução, com efeitos adversos sobre a maturação oocitária, ambiente uterino e desenvolvimento embrionário [86,87]. Vacas com bom ECC possuem os níveis de IGF1 aumentados, o que pode ser bom para o crescimento folicular, mas não para a maturação do oócito necessariamente [88,89]. É provável que este fenômeno se dê em virtude do estímulo da expressão de IGFBPs nos folículos [89]. Em adição, Thatcher et al. [90] sugerem que altos níveis de IGF1 possam acarretar excessivo crescimento embrionário, prejudicando também a manutenção da gestação.

Estas considerações tornam admissível que, nos grupos rbST do estudo 2, a rbST possa ter acarretado aumento exacerbado de IGF1, originando TP menores que as esperadas. Segundo Moseley et al. [91], os níveis de IGF1 elevaram-se significativamente em resposta à administração da rbST. Também foi relatado que, para vacas de menor mérito genético leiteiro, doses superiores

de rbST não resultaram em melhores respostas produtivas (500 mg) ou reprodutivas (650 mg), atribuindo-se estes resultados aos possíveis efeitos prejudiciais da superestimulação de IGF1 [38,40]. No presente estudo, possivelmente, tal efeito teria ocorrido particularmente no GbSTd8, uma vez que o grupo apresentou maiores TCF, influenciado pelo estímulo da rbST, sem melhores consequências à TP.

Dentre as vacas que apresentaram atresia folicular no intervalo de d8 a d10 de cada protocolo, nenhuma foi relativa ao GbSTd8. Não foram verificadas diferenças entre os  $\emptyset$ FD ao d0 ( $P = 0,5014$ ), d8 ( $P = 0,7297$ ) ou d10 (FPO) ( $P = 0,7390$ ) dos protocolos, assim como entre as TAF ( $P = 0,4576$ ). Por sua vez, o GC apresentou valor mais negativo para TAF em relação ao GbSTd0, sendo de  $-1,58 \pm 1,37$  e  $-0,7 \pm 0,99$  respectivamente. Os valores foram inferiores aos verificados por Borges et al. [92], atentando-se ao fato de que, para o valor da TAF do presente trabalho, foram considerados também os valores de FD com crescimento inferior a 5% entre d8 a d10. Entre o número de animais que apresentaram AF, diferença foi constatada entre GbSTd8 e GC ( $P < 0,05$ ), com 2/31(6,5%) para GbSTd0, 0/31(0,0%) para GbSTd8 e 5/30(16,7%) para GC.

No estudo 2, a rbST em vacas *Bos taurus indicus* foi efetiva para aumentar e/ou manter as TCF, com significância quando aplicada junto à retirada da P4 (d8) (Tabela 4). Contudo, as maiores TCF não traduziram-se em elevadas TP. É possível que a rbST tenha exercido efeito negativo sobre o desempenho reprodutivo destes animais, por meio do aumento sérico exacerbado de IGF1 [35].

Mais estudos se fazem necessários para se chegar a doses que seriam as ideais para o emprego da rbST em protocolos para a IATF em vacas *Bos taurus indicus*. As doses seriam provavelmente menores do que aquela empregada no presente estudo.

### 3.3 Estudo 3

Na Tabela 5 estão demonstrados parâmetros relativos aos animais do estudo 3 que apresentaram FDs em crescimento entre d8 a d10.

**Tabela 5** – Diâmetros do maior folículo ( $\varnothing>F$ ), folículo dominante ( $\varnothingFD$ ) e do folículo pré-ovulatório ( $\varnothingFPO$ ), taxa de crescimento folicular (TCF) e taxa de prenhez (TP) de vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas submetidas a diferentes protocolos e que apresentaram crescimento folicular entre d8 a d10. Estudo 3.

Grupos	Vacas em CF d8 a d10 n (%)	$\varnothing>F$ d0 (mm)	$\varnothingFD$ d8 (mm)	$\varnothingFPO$ d10 (mm)	TCF d8 a d10 (mm)	$\varnothingFPO$ prenhes (mm)	$\varnothingFPO$ vazias (mm)	TP n (%)
GbSTd0	38/40 (95,0%) <sup>a</sup>	10,9±2,2	10,9±1,6	14,0±1,4 <sup>a</sup>	3,12±1,15 <sup>a</sup>	14,3±1,1	13,1±1,9	26/40 (65,0) <sup>a</sup>
GbSTd8	32/37 (86,5%) <sup>ab</sup>	10,6±1,9	10,7±1,6	12,9±1,8 <sup>b</sup>	2,27±1,38 <sup>b</sup>	14±0,6	12,2±2,0	14/37 (37,8) <sup>b</sup>
GC	27/34 (79,4%) <sup>b</sup>	11,2±2,1	11,5±1,8	13,0±2,2 <sup>ab</sup>	1,60±1,30 <sup>b</sup>	13,8±2,2	12,3±1,9	14/34 (41,1) <sup>b</sup>
P-valor	<0,05	0,5438	0,2058	0,0343	0,0001	0,5026	0,5136	<0,05

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ao teste Qui-quadrado ( $P<0,05$ ) (Vacas em CF e TP) e aos testes Bonferroni ou Tukey (demais variáveis, P-valor pelo teste ANOVA). CF = crescimento folicular; d = dia.

No estudo 3 o número de animais com FD em crescimento de d8 a d10 foi significativamente maior ( $P<0,05$ ) em prol do GbSTd0 vs. GC. Como dado relevante, observa-se a maior TP do GbSTd0 ( $P<0,05$ ) perante os demais grupos (Tabela 5).

Neste estudo (3) verificou-se que o perfil das vacas (raça, DPP, e ECC [3,5±0,4 e 3,5, média e mediana]) proporcionou maior consistência às ações da rbST, quando administrada ao d0 do protocolo. Conforme já discutido, diferenças de intensidade de metabolismo entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* devem ser consideradas. Vacas indicas detêm teores mais elevados de IGF1 que taurinas [30,31]. Por isso, há fundamentos de que, em *Bos taurus taurus*, o provável aumento de IGF1 acarretado pela dose de 250 mg de rbST tenha atuado benéficamente em pró da eficiência reprodutiva. Em estudo realizado com vacas cruzadas taurinas (Angus), uma dose de 650mg de rbST foi administrada ao início do protocolo de IATF (CO-Synch + CIDR) [40]. Significativa diferença plasmática de IGF1 ( $P<0,05$ ) foi relatada nas fêmeas tratadas com rbST em relação ao grupo controle ( $372,4 \pm 16,6$  vs.  $193,7 \pm 16,6$  ng/mL, respectivamente). No entanto, as TP foram significativamente reduzidas ( $P<0,05$ ) nas vacas tratadas com a rbST em relação as não tratadas (29,9% e 42,5%, respectivamente). Os autores acreditaram que a dose de 650 mg de rbST possa ter gerado excessivo teor de IGF1, comprometendo o ambiente uterino e desenvolvimento embrionário, fato já correlacionado anteriormente à baixos

índices reprodutivos [86,87]. Em outro estudo, Kaminski et al. [14] empregaram a dose de 500 mg ao d0 do protocolo em vacas *Bos taurus taurus*, obtendo maior TCF e ØFPO quando comparado ao grupo de animais sem a rbST. Verificou-se a TCF de 1,7 mm/dia e ØFPO de 14,5 mm. O presente estudo, ao utilizar a dose de 250 mg ao d0 do protocolo (GbSTd0), demonstrou resultados similares aos de Kaminski et al. [14]. Sendo assim, acredita-se que a presente dose já seja suficiente ao estímulo reprodutivo em vacas *Bos taurus taurus* e cruzadas.

Os favoráveis achados do presente estudo corroboram a correlação de que o emprego da rbST melhora o desenvolvimento embrionário quando aplicado em animais *Bos taurus taurus* [34,35]. No GbSTd0, a rbST foi administrada ao início do protocolo, exercendo efeitos sobre os folículos da nova onda folicular que emergiria 3 a 3,5 dias depois [93]. O IGF1 parece mediar os efeitos da rbST principalmente sobre os folículos menores, estimulando a proliferação das células da granulosa e teca interna e a esteroidogênese, atuando em sinergismo às gonadotrofinas [89]. Sendo assim, pressupõe-se que a rbST tenha contribuído para a maior TCF, impactando em maiores dimensões ao FPO e aumento da produção de E2 intrafolicular, com liberação mais eficiente do pico pré-ovulatório de LH e satisfatória sincronia da ovulação [60,67,94].

Ao se analisar a diferença dos ØFD de d8 a d10, verifica-se expressivo crescimento (TCF) em prol do GbSTd0 em relação aos demais ( $P = 0,0001$ ). Mesmo a rbST agindo por meio da IGF1 principalmente sobre pequenos folículos [89], estando os animais do GbSTd0 expostos aos efeitos da rbST desde o início da onda folicular, o expressivo crescimento (TCF) por parte deste grupo se expressou apenas após d8. Uma justificativa plausível para este fato estaria ligada ao efeito inibitório causado pela P4 (implante intravaginal) sobre a frequência dos pulsos de LH [95]. Foi demonstrado que, nos folículos, o IGF1 age maximizando os efeitos das gonadotrofinas, estimulando significativamente a atividade mitogênica e esteroidogênica das células da granulosa e da teca interna [96,97,98,99]. Estes efeitos seriam possíveis pelo aumento do número de receptores para as gonadotrofinas e seus efeitos de crescimento folicular [100,101]. Sendo assim, ao estímulo do IGF1, os FDs das vacas do GbSTd0 desenvolveram, provavelmente, significativo número de receptores até o d8 do protocolo – os quais já iniciam sua expressão a partir de 8,0 mm de diâmetro

[102]. Com o retorno da frequência dos pulsos de LH após a retirada da P4 [95], os FDs foram capazes de expressar todo seu potencial de crescimento adquirido [103], traduzindo-se em maiores TCF e TP ( $P < 0,05$ ). A expressão de receptores de LH (LHR) nas células da granulosa é maior em folículos cuja concentração intrafolicular de E2 é maior [104]. Assim, é plausível que os FDs das vacas do GbSTd0 apresentassem maior número de LHRs ao d8 em comparação aos demais grupos, resultando nos resultados observados (Tabela 5).

Ademais, o estudo de Kaminski et al. [14] fez alusão à elevada TO nas vacas tratadas com a rbST ao d0, culminando com 90,9% de ovulações ao d15, sendo tal efeito atribuído à maior TCF antes da ovulação, corroborando aos relatos de [105]. No presente estudo a TO não foi avaliada, mas é possível que, em função da maior TCF e TP observadas, também tenha havido TO superior no GbSTd0 vs. demais grupos.

A incidência de atresia folicular no estudo 3 foi relativamente reduzida, comparativamente ao número total de animais nos grupos. No entanto, ao se comparar o percentual de animais com atresia nos FDs entre d8 a d10, verificou-se diferença entre GbSTd0 e GC ( $P < 0,05$ ), com 5,0% (2/40) para GbSTd0, 13,5% (5/37) para GbSTd8 e 20,6% (7/34) para GC. Entre as TAF também não houve diferenças ( $P = 0,7051$ ).

Como visto, todos os efeitos da rbST estariam ligados à maior síntese e liberação hepática de IGF1 em resposta à rbST [91], ao aumento intrafolicular de IGF1, assim como de E2 [67]. Provavelmente, no GbSTd0, a capacidade de resposta às gonadotrofinas e a esteroidogênese folicular tenham sido ampliadas em resposta ao aumento de IGF1 gerado pela rbST [106,107], elevando, em consequência, suas chances de ovulação [67] – o que traduziu-se em melhores resultados de TCF ( $P = 0,0001$ ) e TP ( $P < 0,05$ ), quando comparadas aos demais grupos.

Assim, a hipótese de que a rbST poderia acarretar ações de incremento às TCF e TP quando administrada em protocolos para a IATF, confirmou-se neste estudo.

#### **4. CONCLUSÕES**

Concluiu-se que a rbST mostrou-se eficaz na promoção do crescimento folicular e na melhora da TP quando aplicada a vacas de corte *Bos taurus taurus*

e/ou cruzadas, em bom ECC, ao início do protocolo de IATF. Quando em vacas *Bos taurus indicus* em bom/regular ECC, a rbST demonstrou incrementar o crescimento folicular se aplicada ao dia 8 do protocolo, não aumentando a TP. Em vacas *Bos taurus indicus* portando baixo ECC, a rbST não promoveu melhora reprodutiva, não sendo recomendada, confirmando-se o emprego da eCG mais eficiente à reprodução deste perfil de animais. A rbST demonstrou bom potencial à promoção do crescimento folicular ovariano, no entanto, mais estudos se fazem necessários em busca de doses, momentos e maneiras de aplicação ideais aos protocolos de IATF em diferentes perfis de animais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a empresa Elanco™ Brasil pela concessão do hormônio rbST (Lactotropin™) em apoio a este estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Não há conflitos de interesses para esta publicação.

## **REFERÊNCIAS**

- [1] Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol Reprod.* 1988;39:308- 17.
- [2] Tribulo HE, Bo GA, Kastelic JP, Pawlyshyn V, Barth AD, Mapletoft RJ. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17 $\beta$  and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology.* 1995;43:340.
- [3] Caccia M, Bó GA. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology.* 1998;49:341.
- [4] Cavalieri J, Coleman C, Rodrigues H, Macmillan KL, Fitzpatrick LA. The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronized with a progesterone releasing intravaginal insert. *Aust Vet J.* 2002;80:217-223, 2002.

- [5] Bó GA, Baruselli OS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 2002;57(1):53-72.
- [6] Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim*. 2012;47:134–41.
- [7] Bó GA, De La Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*. 2016;86:388–96.
- [8] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*. 1991;2:27–44.
- [9] Lonergan P, O`Hara L, Forde N. Papel da progesterona do diestro na função endometrial e desenvolvimento do concepto em bovinos. *Anim Reprod*. 2013;10(3):119-23.
- [10] Sales JNS, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*. 2011;124:12-18.
- [11] Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro Júnior I, Baruselli PS, et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 2016;85:792-99.
- [12] Kirby CJ, Wilson SJ, Lucy MC. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci*. 1997b;80(2):286-94.
- [13] Lucy MC, Curran TL, Collier RJ, Cole WJ. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology*. 1994;41(2):561-72.
- [14] Kaminski AP, Carvalho MLA, Segui Ms, Kozicki LE, Pedrosa VB, Weiss RR, Bergstein-Galan TG. Impact of recombinant bovine somatotropin, progesterone, and estradiol benzoate on ovarian follicular dynamics in *Bos taurus taurus* cows

using a protocol for estrus and ovulation synchronization. *Theriogenology*. 2019;140:58-61.

[15] Gong JG, Brantley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod*. 1991;45:941-49.

[16] Bartolome J, Hernandez J, Landaeta A, Lelleman A, Sheerin P, Risco CA, et al. The effect of interval from day of administration of bovine somatotropin (bST) to synchronization of ovulation on timed-insemination conception rate of dairy cows with and without ovarian cysts. *Theriogenology*. 2002;57:1293-301.

[17] Baruselli PS, Elliff FM, Silva LG, Catussi BLC, Bayeux BM. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*. 2019;43(2):315-26.

[18] Gong JG, Baxter G, A BT, Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil*. 1997;110:91-97.

[19] Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev*. 1998;78:745-61.

[20] Gong JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23(1-2):229-41.

[21] Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci*. 2000;83:1237-47.

[22] Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:109-26.

[23] Kirby CJ, Smith MF, Keisler DH, Lucy MC. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J Dairy Sci*. 1997a;80(2):273-85.

- [24] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*. 1997;47:1489-1505.
- [25] Hernández-Cerón J, Gutierrez-Aguilar CG. La Somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*. 2013;47:35-45.
- [26] Burton JL, Mc Bride BN, Block E, Glimm DR, Kennely JJ. A review of bovine growth hormone. *J Anim Sci*. 1994;74:167-200.
- [27] Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 2002;123: 371-8.
- [28] Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci*. 2001;84:113-19.
- [29] Lucy MC, Escalante RC, Keisler DH, Lamberson WR, Mathew DJ. Short communication: Glucose infusion into early postpartum cows defines an upper physiological set point for blood glucose and causes rapid and reversible changes in blood hormones and metabolites. *J Dairy Sci*. 2013;96(9):5762- 68.
- [30] Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*. 1994;15:342-355.
- [31] Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci*. 2000;78:1291–302.
- [32] Bastos MR, Mattos MCC, Meschiatti MAP, Surjus RS, Guardieiro MM, Ferreira JCP, et al. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Sci Vet*. 2010;38:776.
- [33] Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*. 2016;86(1):32-40.

- [34] Hasler JF, Bilby CR, Collier RJ, Denham SC, Lucy MC. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*. 2003;59:1919-28.
- [35] Martins CM, Reis PO, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Baruselli PS. Efeito da sincronização da onda de crescimento folicular e do tratamento com bST ou eCG na OPU-PIV de doadoras Nelore, Brangus e Holandesas. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2012, Foz do Iguaçu, Paraná. 2012. P.403.
- [36] Shingu H, Hodate K, Kushibiki S, Ueda Y, Watanabe A, Shinoda M, et al. Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002;132:493-504.
- [37] Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2002;85:2831-42.
- [38] Fontes CJ, Meserole VK, Mattos W, Barros RP, Wu Z, Huber JT. Response of brazilian crossbred cows to varying doses of bovine somatotropin. *J Dairy Sci*. 1997;80:3234-40.
- [39] Phipps RH, Hard DL, Adriens F. Use of bovine somatotropin in the tropics: the effect of sometribove on milk production in Western, Eastern, and Southern Africa. *J Dairy Sci*. 1997;80:504-10.
- [40] Oosthuizen N, Fontes P, Henry D, Ciriaco F, Sanford C, Canal L, et al. Administration of recombinant bovine somatotropin prior to fixed-time artificial insemination and the effects on fertility, embryo, and fetal size in beef heifers. *J Anim Sci*. 2018;96(5):1894–1902.
- [41] Lowman BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle: the east of Scotland. Edinburgh: College of Agriculture (Bulletin). 1976;6:1-31.
- [42] Ferreira AM. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). 1ed. Juiz de Fora: Editar; 2010.
- [43] Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq agropec Bras*. 2000;35(12):2501-09.

- [44] Coutinho GTRM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LS, Ferreira AM, Palhão PM, et al. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59:1089-96.
- [45] Gottschall CS, Almeida MR, Magero J, Tolotti F. Fatores Associados à Fertilidade da Fêmea Bovina Submetida à IATF. In: *Anais do XIV Ciclo de Palestras em Produção e Manejo de Bovinos*, 2011; Canoas. 2011. P.89-101.
- [46] Ferreira AM. Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras [tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – UFV; 1990.
- [47] Ferreira AM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LSA, Verneque RS. Restrição alimentar e atividade ovariana luteal cíclica pós-parto em vacas girolanda. *Pesq Agropec Bras.* 2000;35:2521-28.
- [48] Vanholder T, Opsomer G, De Kruif A. A etiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 2006;46:105–19.
- [49] Bastos GM, Brenner RH, Willke FH, Neves JP, Oliveira JFC, Bragança JFM, et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology.* 2004;62:847-53.
- [50] Stagg K, Spicer LJ, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol Reprod.* 1998;59:777-83.
- [51] Williams GL. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *J Anim Sci.* 1990;68:831-52.
- [52] Nett TM, Cermak D, Braden T, Manns J, Niswender G. Pituitary receptors for GnRH and estradiol and pituitary content of gonadotropins in beef cows II. Changes during the postpartum period. *Domest Anim Endocrinol.* 1988;5:81-9.
- [53] Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 1999;57:23–33.
- [54] Amaral TF, Borges AM, Ruas JRM, Torres CAA; Henry MRJM, Coelho SG, et al. Influência do diâmetro do folículo dominante sobre a taxa de ovulação de

vacas da raça Gir Leiteiro em anestro pós-parto. In: Reunião Brasileira da Sociedade de Zootecnia, 45, 2008.

[55] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*. 2000;54:25-55.

[56] McDougall S, Compton C. Reproductive Performance of Anestrous Dairy Cows Treated with Progesterone and Estradiol Benzoate. *J. Dairy Sci*. 2005;88:2388-400.

[57] Silveira AP, Costa MZ, Gabriel Filho LRA, Castilho C. Efeito do período pós-parto sobre a taxa de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF (inseminação artificial em tempo fixo). *Colloq Agrariae*. 2010;6(2):40-45.

[58] Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulation hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2003;78:345-70.

[59] Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotrophin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: cycling cows. *J Anim Sci*. 2010;88:2300-10.

[60] Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JLM. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology*. 2009;72:378-85.

[61] Simões RAL, Satrapa RA, Rosa FS, Piagentini M, Castilho ACS, Ereno RL, et al. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*. 2012;77:139-47.

[62] Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, Macneil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*. 2007;85:684-9.

[63] Schams D, Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23:53-65.

[64] Driancourt JC. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 2001;55:1211-39.

- [65] Siqueira LG, Torres CAA, Amarin LS, Souza ED, Camargo LSA, Fernandes CAC, et al. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2009;115:18-28.
- [66] Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3-34.
- [67] Acosta DAV, Schneider A, Jacometo CB, Rincon JA, Cardoso F, Correa MN. Effect of bovine somatotropin injection in late pregnant Holstein heifers on metabolic parameters and steroidogenic potential of the first postpartum dominant follicle. *Theriogenology.* 2017;104:164-72.
- [68] Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol.* 2003;176:205-17.
- [69] Hauser SD, Mcgrath MF, Collier RJ, Krivi GG. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;72(3):187-200.
- [70] Lucy MC. Growth hormone regulation of follicular growth. *Reprod Fertil Dev.* 2011;24(1):19-28.
- [71] Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J, Butler A. The Somatomedin Hypothesis. *Endocr Rev.* 2001;22:53-74.
- [72] Etherton TD. Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci.* 2004;82:239-44.
- [73] Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:31-44.
- [74] Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci.* 1999;77:1536-46.

- [75] Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev.* 1999;79:511-607.
- [76] Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, et al. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007;90:4022-32.
- [77] Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999;54:411-24.
- [78] Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology.* 2008;69:852-858.
- [79] Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology.* 2008;69:167-75.
- [80] Vasconcelos JL, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology.* 2003;60(5):795-807.
- [81] Bauman DE. Bovine somatotropin and lactation from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol,* 1999;17:101-16.
- [82] Baldrighi JM, Sa Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, et al. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim.* 2014;49:1015–20.
- [83] Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintao CCR, Gama MAS, Freitas C, et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci.* 2015;98:3086–99.
- [84] Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, et al. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Anim Reprod.* 2013;10:199–205.

- [85] Bastos MR. Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus* [tese]. Botucatu: Universidade de Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2012.
- [86] McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod.* 2000;63:267-73.
- [87] Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 2004;82:63-74.
- [88] Armstrong DG, Gong JG, Webb R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction.* 2003;61:403-14.
- [89] Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 2007;68:S22-S29.
- [90] Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JE. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology.* 2006;65(1):30-44.
- [91] Moseley WM, Paulissen JB, Goodwin MC, Alaniz GR, Claflin WH. Recombinant bovine somatotropin improves growth performance in finishing beef steers. *J Anim Sci.* 1992;70(2):421-25.
- [92] Borges AM, Torres CAA, Rocha Jr VR, Ruas JRM, Carvalho GR, Neto AM, et al. Desenvolvimento folicular no pós-parto de vacas da raça Gir tratadas com acetato de buserelina (GnRH) ou gonadotrofina coriônica humana (hCG). *R Bras Zootec.* 2004;33(6):1396-1404.
- [93] Macmillan KL, Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod.* 1991;45:883-9.
- [94] Putman DE, Varga GA, Dann HM. Metabolic and production responses to dietary protein and exogenous somatotropin in late gestation dairy cows. *J Dairy Sci.* 1999;82:982-95.
- [95] Pfeifer LFM, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small JÁ, Adams GP, Dionello NJ, et al. Effects of lows versus physiologic plasma progesterone concentrations on

ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology*. 2009;72:1237-50.

[96] Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Endocrinol*. 1993;97:247–254.

[97] Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod*. 1997;56:608–16.

[98] Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production *In vitro* 1. *J Anim Sci*. 1993;71:1232-41.

[99] Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;22(4):237-54.

[100] Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*. 2000;83(7):1635-47.

[101] Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol Reprod*. 2004;71:17-27.

[102] Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol Reprod*. 2001;64:197-205.

[103] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 1997;47:23-32.

[104] Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*. 2000;167:371-82.

[105] Gong JG, Wilmut I, Bramley TE, Webb R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulation in response to FSH in heifers. *Theriogenology* 1996;45:611-22.

[106] Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*. 1997;2:138-46.

[107] Silva JRV, Figueiredo JR, Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factors (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009;71:1193-208.

## CAPITULO 3

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hormônio rbST mostrou-se eficaz na promoção do crescimento folicular de vacas com ECC  $\geq 3,0$ , gerando melhores resultados de prenhez quando aplicado a vacas taurinas ou mestiças taurinas. Quando aplicado a vacas em baixo ECC ( $\leq 2,5$ ), o hormônio não promoveu influência positiva sobre a reprodução.

Os autores acreditam que este hormônio possua grande potencial como promotor de crescimento de estruturas ovarianas, sendo necessário, no entanto, mais estudos para se chegar a doses e momentos que seriam os ideais para o emprego do mesmo em protocolos para a IATF. É necessário que seja levado em consideração as divergências metabólicas e hormonais ligadas a genética dos animais, para que então se possa explorar a fundo o potencial da rbST.

Sugere-se, para estudos futuros, que diferentes momentos e doses deste hormônio – provavelmente menores, sejam testadas para vacas *Bos taurus indicus*, assim como para *Bos taurus taurus*. A dosagem sérica de IGF1 concomitante ao emprego da rbST em protocolos de IATF também seria de grande riqueza informacional, a ser considerada a próximos estudos.

## REFERÊNCIAS

Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci.* 2000;78:1291–302.

Amaral TF, Borges AM, Ruas JRM, Torres CAA; Henry MRJM, Coelho SG, et al. Influência do diâmetro do folículo dominante sobre a taxa de ovulação de vacas da raça Gir Leiteiro em anestro pós-parto. In: Reunião Brasileira da Sociedade de Zootecnia, 45, 2008.

Anuário da Pecuária Brasileira (ANUALPEC). Rebanho bovino brasileiro. São Paulo: FNP. 2018.

Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 2002;123: 371-8.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). Sumário 2018. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 20/08/2019.

Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). Index ASBIA 2017. [publicação online]. Disponível em: [http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2018/10/INDEX-ASBIA-2017\\_completo.pdf](http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2018/10/INDEX-ASBIA-2017_completo.pdf). Acesso em: 20/08/2019.

Azizan ABR, Phipps RH. Bovine somatotropina hormone (BST). II. Effects of dosage rate and calcium soap supplementation on milk yield responses of crossbred Sahiwal-Friesian dairy cattle. *J of Tropical Agric Food Sci.* 1999;27:259-64.

Badinga L, Collier RJ, Thatcher WW, Wilcox CJ. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J Dairy Sci.* 1985;68(1):78-85.

Baldrighi JM, Sa Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, et al. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population

in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim.* 2014;49:1015–20.

Bartolome J, Hernandez J, Landaeta A, Lelleman A, Sheerin P, Risco CA, et al. The effect of interval from day of administration of bovine somatotropin (bST) to synchronization of ovulation on timed-insemination conception rate of dairy cows with and without ovarian cysts. *Theriogenology.* 2002;57:1293-301.

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:479-86.

Baruselli PS, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Sá Filho MF. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod.* 2012a;9:139-52.

Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim.* 2012b;47:134–41.

Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA; Elliff FM; Freitas BG. Timed artificial insemination: current challenges and recent conquests for improving the efficiency in the field. *Anim Reprod.* 2017;14(3):558-71.

Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal.* 2018;12:45-52.

Baruselli PS. Avaliação do mercado de IATF no Brasil. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP.* 2019a;1. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 01/09/2019.

Baruselli PS, Elliff FM, Silva LG, Catussi BLC, Bayeux BM. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim.* 2019b;43(2):315-26.

Bastos GM, Brenner RH, Willke FH, Neves JP, Oliveira JFC, Bragança JFM, et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology.* 2004;62:847-53.

Bastos MR, Mattos MCC, Meschiatti MAP, Surjus RS, Guardieiro MM, Ferreira JCP, et al. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Sci Vet.* 2010;38:776.

Bastos MR. Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus* [tese]. Botucatu: Universidade de Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2012.

Bauman DE, Eisemann JH, Currie WB. Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Fed. Proc.* 1982;41:2538-44.

Bauman DE, Mccutcheon SN, Steinhour WD, Eppard PJ, Sechen SJ. Sources of variation and prospects for improvement of productive efficiency in the dairy cow: a review. *J Anim Sci.* 1985;60:538-92.

Bauman DE. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci.* 1992;75:3432-51.

Bauman DE. Bovine somatotropin and lactation from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol*, 1999;17:101-16.

Bishop DK, Wettemann RP, Spicer LJ. Body energy reserve influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. *J Dairy Sci.* 1994;72:2703-08.

Bó GA, Baruselli OS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.* 2002;57(1):53-72.

Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos Indicus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:307-26.

Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:223-36.

Bó GA, De La Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology.* 2016;86:388–96.

Buratini Jr J, Price CA, Visintin JA, Bó GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*. 2000;54:421-31.

Buratini Jr J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*. 2007;31:190-196.

Burton JL, Mc Bride BN, Block E, Glimm DR, Kennely JJ. A review of bovine growth hormone. *J Anim Sci*. 1994;74:167-200.

Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 2008;69:167-75.

Ciccioli NH, Wettemann RP, Spicer LJ, Lents CA, White FJ, Keisler DH. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *J Anim Sci*. 2003;81:3107-20.

Cissé M, Seck M, Bâ-Diao M, Sané I. Effect of bovine somatotropina on milk collected after suckling in Djakore indigenous cows (*Bos indicus* x *Bos taurus*) in Senegal. *Ann de Zootech*. 1996;45:269-75.

Cutaia L, Tríbulo R, Moreno D, Bó GA. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology*. 2003;59:216.

Cuttler L. The regulation of growth hormone secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996;25(3):541-71.

De La Sota RLM, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 1993;76:1002-13.

Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulation hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2003;78:345-70.

Emerick LL, Dias JC, Vale Filho VR, Silva MA, Andrade VJ, Leite TG et al. Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino

criopreservado para prever o índice de prenhez. *Ciênc Anim Bras.* 2011;12:536-46.

Eppard PJ, Bauman DE, Mccutcheon SN. Effect of dose of bovine growth hormone on lactation of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1985;68:1109-15.

Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev.* 1998;78:745-61.

Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:31-44.

Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF2alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology.* 2001;55:1521-32.

Ferreira AM. Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras [tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – UFV; 1990.

Ferreira AM. Nutrição e atividade ovariana: uma revisão. *Pesq Agropec Bras.* 1993;28(9):1077-93.

Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology.* 1997;47:1489-1505.

Fontes CJ, Meserole VK, Mattos W, Barros RP, Wu Z, Huber JT. Response of brazilian crossbred cows to varying doses of bovine somatotropin. *J Dairy Sci.* 1997;80:3234-40.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:135-63.

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:109-26.

Gaievski FR, Lamb GC, Weiss RR, Bertol MAF, Segui MS, Abreu ACMR. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and equine chorionic gonadotropin

(eCG) improve the pregnancy rate on protocols for timed artificial insemination in beef cattle. *Vet e Zootec.* 2015; 22(3):471–80.

Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sa Filho MF, et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology.* 2015;83:385-93.

Gluckman PD, Breier BH, Davis SR. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *J Dairy Sci.* 1987;70(2):442-66.

Gong JG, Brantley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod.* 1991;45:941-49.

Gong JG, Brantley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil.* 1993a;97(1):247-54.

Gong JG, Bramley TA, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod.* 1993b;48(5):1141-49.

Gong JG, Baxter G, A BT, Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil.* 1997;110:91-97.

Gong JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23(1-2):229-41.

Gottschall CS, Almeida MR, Magero J, Tolotti F. Fatores Associados à Fertilidade da Fêmea Bovina Submetida à IATF. In: *Anais do XIV Ciclo de Palestras em Produção e Manejo de Bovinos*, 2011; Canoas. 2011. P.89-101.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod.* 2000;62:1322-8.

Hartnell, GF, Franson SE, Bauman DE, Head HH, Huber JT, Lamb RC, et al. Evaluation of sometribove in a prolonged-release system in lactating dairy cows – production responses. *J Dairy Sci.* 1991;74:2645-63.

Hasler JF, Bilby CR, Collier RJ, Denham SC, Lucy MC. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology.* 2003;59:1919-28.

Hauser SD, Mcgrath MF, Collier RJ, Krivi GG. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;72(3):187-200.

Hernández-Cerón J, Gutierrez-Aguilar CG. La Somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia.* 2013;47:35-45.

Herrler A, Einspanier R, Schams D, Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology.* 1994;4 1:601-11.

Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990;190(3):445-62.

Hutton JB. The effect of growth hormone on the yield and composition of cow's milk. *J Endocrinol.* 1957;16:115-25.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). Efetivo do rebanho brasileiro. 2018a. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em: 20/09/2019.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção Pecuária Municipal, Principais Resultados. 2018b. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?t=destaques>. Acesso em: 20/09/2019.

Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:372-77.

Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev.* 1997;47(2):175-80.

Izadyar F, Van Tol HT, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol Reprod Dev.* 2000;57(3):247-55.

Jimenez-Krassel F, Binelli M, Tucker HA, Ireland JJ. Effect of long-term infusion with recombinant growth hormone-releasing factor and recombinant bovine somatotropin on development and function of dominant follicles and corpora lutea in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1999;82(9):1917-26.

Kaminski AP, Carvalho MLA, Segui Ms, Kozicki LE, Pedrosa VB, Weiss RR, Bergstein-Galan TG. Impact of recombinant bovine somatotropin, progesterone, and estradiol benzoate on ovarian follicular dynamics in *Bos taurus taurus* cows using a protocol for estrus and ovulation synchronization. *Theriogenology.* 2019;140:58-61.

Kirby CJ, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Lucy MC. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. *Biol Reprod.* 1996;55(5):996-1002.

Kirby CJ, Smith MF, Keisler DH, Lucy MC. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J Dairy Sci.* 1997a;80(2):273-85.

Kirby CJ, Wilson SJ, Lucy MC. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci.* 1997b;80(2):286-94.

Kuehner LF, Rieger D, Walton JS, Zhao X, Johnson WH. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology.* 1993;40:1003-13.

Kuzmina TI, Alm H, Denisenko V, Tuchscherer A, Kanitz W, Torner H. Effect of Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) on Cytoplasmic Maturation of Bovine

Oocytes and Their Developmental Competence In Vitro. *J Reprod Dev.* 2006;53:309-16.

Lamb GC, Mercadante VRG. 2016. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2016;32:334-35.

Lee HJ, Hwang S, Yoon JT. Effects of bovine somatotropin (bST) administration combined with controlled internal drug release (CIDR) on embryo quality and pregnancy of Hanwoo (Korean native beef cattle) during commercial embryo transfer program. *J Dairy Sci.* 2007;20:194-9.

Lents CA, White FJ, Ciccioli NH, Floyd-White LN, Rubio I, Keisler DH, et al. Metabolic status, gonadotropin secretion, and ovarian function during acute nutrient restriction of beef heifers. *J Anim Sci.* 2013;91(9):4146-57.

Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology.* 1998;139:2342-7.

Lonergan P, O'Hara L, Forde N. Papel da progesterona do diestro na função endometrial e desenvolvimento do conceito em bovinos. *Anim Reprod.* 2013;10(3):119-23.

Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 1993a;48(6):1219-27.

Lucy MC, De La Sota RL, Staples CR, Thatcher WW. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J Dairy Sci.* 1993b;76:1014-27.

Lucy MC, Curran TL, Collier RJ, Cole WJ. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology.* 1994;41(2):561-72.

Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci.* 2000;83(7):1635-47.

Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci.* 2001;84(6):1277-93.

Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci.* 2001;84:113-19.

Lucy MC. Growth hormone regulation of follicular growth. *Reprod Fertil Dev.* 2011;24(1):19-28.

Lucy MC, Escalante RC, Keisler DH, Lamberson WR, Mathew DJ. Short communication: Glucose infusion into early postpartum cows defines an upper physiological set point for blood glucose and causes rapid and reversible changes in blood hormones and metabolites. *J Dairy Sci.* 2013;96(9):5762-68.

Macmillan KL, Thatcher WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod.* 1991;45:883-9.

Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 1999;57:23–33.

Martins CM, Reis PO, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Baruselli PS. Efeito da sincronização da onda de crescimento folicular e do tratamento com bST ou eCG na OPU-PIV de doadoras Nelore, Brangus e Holandesas. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2012, Foz do Iguaçu, Paraná. 2012. P.403.

Martins T, Talamoni JP, Sponchiado M, Maio JRG, Nogueira GP, Pugliesi G, et al. Impact of estradiol cypionate prior to TAI and progesterone supplementation at initial diestrus on ovarian and fertility responses in beef cows. *Theriogenology* 2017;104:156-63.

McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod.* 2000;63:267-73.

Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 2000;83:1237-47.

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001;84:1646-56.

Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev.* 1991;2:27–44.

Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD. Progresso científico na primeira década do século XXI. *Rev Bras Zootec.* 2010;39:414-21.

Peel CJ, Fronk TJ, Bauman DE, Gorewit RC. Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1983;66:776-82.

Oosthuizen N, Fontes P, Henry D, Ciriaco F, Sanford C, Canal L, et al. Administration of recombinant bovine somatotropin prior to fixed-time artificial insemination and the effects on fertility, embryo, and fetal size in beef heifers. *J Anim Sci.* 2018;96(5):1894–1902.

Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro Júnior I, Baruselli PS, et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology.* 2016;85:792-99.

Phipps RH, Hard DL, Adriens F. Use of bovine somatotropin in the tropics: the effect of sometribove on milk production in Western, Eastern, and Southern Africa. *J Dairy Sci.* 1997;80:504-10.

Randel RD. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci.* 1990;68:853-62.

Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA and Macmillan KL. Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci.* 2003;86:1876-94.

Rodenburg JB. Body condition scoring of dairy cattle. *Factseet.* Ministry of Agriculture and Food, Ontario. 1992.

Rodgers JC, Bird SL, Larson JE, DiLorenzo N, Dahlen CR, DiCostanzo A, Lam GC. An economic evaluation of estrous synchronization and timed artificial insemination in suckled beef cows. *J Anim Sci.* 2015;10:1297-1308.

Rutter LM, Randel RD. Postpartum nutrient intake and body condition: Effect on pituitary function and onset of estrus in beef cattle. *J Anim Sci.* 1984;58(2):265-74.

Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 2011;76:455-63.

Sá Filho MF, Penteado L, Reis EL, Reis TANPS, Galvão KN, Baruselli PS. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology*. 2013;79:625-32.

Sales JNS, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*. 2011;124:12-18.

Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintao CCR, Gama MAS, Freitas C, et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci*. 2015;98:3086–99.

Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, et al. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Anim Reprod*. 2013;10:199–205.

Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*. 2016;86(1):32-40.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 1988;83:663-71.

Scippo ML, Degand G, Duyckaerts A, Maghuin-Rogister G. Identification des vaches laitières traitées à somatotropine Bovine. *Ann Méd Veterinario*. 1997;141:381-90.

Selk GE, Wettemann RP, Lusby KS, Oltjen JW, Mobley SL, Rasby RJ, et al. 1988. Relationship among body weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. *J. Anim. Sci*. 1988;66:3153-59.

Severo NC. Impacto na Inseminação artificial na indústria bovina no Brasil e no mundo. *Rev V & Z em Minas*. 2009a; 101:16–22.

Severo NC. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *Hora Vet.* 2009b; 167:36–9.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994;15:342-355.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol Reprod.* 1988;39:308- 17.

Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 1995;12(3):223-45.

Standerholen FB, Waterhouse KE, Larsgard AG, Garmo RT, Myromslien FD, Sunde J, Ropstad E, Klinkenberg G, Kommisrud E. Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind artificial insemination trial. *Theriogenology.* 2015; 84:413-20.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology.* 2001;56:1435-40.

Torres-Júnior JRS, Penteado L, Sales JNS, Sá Filho MF, Ayres H, Baruselli PS. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. *Anim Reprod Sci.* 2014;151(1-2):9-14.

Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction.* 2009;137:161-80.

Vizcarra JA, Wettemann RP, Spitzer JC, Morrison DG. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 1998;76:927-36.

Walters KA, Binnie JP, Campbel BK, Armstrong DG, Telfer EE. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction.* 2006;131:515-23.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 2004;82:63-74.

Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology.* 2000;54:25-55.

Zhou J, Bievre M, Bondy CA. Reduced GLUT1 expression in *Igf1*<sup>-/-</sup> null oocytes and follicles. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF. Research Society.* 2000;10:111-17.

## ANEXO (S)

### **Anexo 1. Guia resumido para submissão de artigo para a revista Theriogenology**

#### **Article structure**

##### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

##### ***Results***

Results should be clear and concise.

##### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

##### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions

section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Highlights**

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Nomenclature and units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

### ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

## **Artwork**

### ***Image manipulation***

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

***Text graphics***

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you

are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

## **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## **References**

### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your

Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order

in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1> .

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

***Journal Abbreviation Source***

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

## **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **Additional Style Notes**

#### ***Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions***

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.

- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

***Use the following expressions***

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

***Standard definitions***

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life

- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

### **Abbreviations**

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 $\alpha$	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

### *Units of Measure*

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

$\mu$ L - microliter

m - meter  
min - minute  
mo - month  
s - second  
v:v - volume ratio  
wk - week  
wt/vol - weight per volume  
y - year

*Routes of treatment*

id - intradermal  
im - intramuscular  
iu - intrauterine  
iv - intravenous  
sc - subcutaneous  
po - oral

*Statistical expressions*

ANOVA - analysis of variance  
CV - coefficient of variation  
df - degrees of freedom  
F - variance ratio  
NS - not significant  
P - probability  
SD - standard deviation  
SEM - standard error of the mean  
r - correlation coefficient  
 $r^2$  - coefficient of regression

***Additional information***

- For issues of style and format not addressed here, please consult Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and

usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.

- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

## Anexo 2. Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 06 de junho de 2019

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 01608 – 3ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** *AÇÃO DA SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA E DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA NA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE VACAS BOS TAURUS INDICUS EM PROTOCOLOS PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO CM VISTAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO*

#### PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ ERNANDES KOZICKI

#### EQUIPE DE PESQUISA

GRASSIELE GASSENFERTH

#### INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

#### ESCOLA E/OU CURSO

Escola de Ciências da Vida – Medicina Veterinária

<b>VIGÊNCIA DO PROJETO</b>	15/12/2018 A 30/07/2019	<b>QUANTIDADE DE ANIMAIS</b>	600
<b>ESPECIE/LINHAGEM</b>	<i>Bos taurus indicus</i>	<b>Nº SISBIO</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
<b>SEXO</b>	Fêmea	<b>ATIVIDADES</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
<b>IDADE / PESO</b>	2,5 a 7,5 / 400 a 600 kg	<b>ESPECIE – GRUPO</b> <b>TAXONÔMICOS</b> (de vida livre)	Não se aplica
<b>ORIGEM DO ANIMAL</b>	Fazendas Comerciais	<b>LOCAL (IS)</b> (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA sendo **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança de protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,  
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha  
Coordenador – CEUA PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br