

Aspectos morfofisiológicos e biotécnicas aplicadas à reprodução de novilhas bovinas e búfalas pré-púberes

Morphophysiological aspects and biotechnologies applied to the reproduction of prepubertal bovine and buffalo heifers

Mário Martins Guimarães¹, Louise Carneiro de Carvalho², André de Medeiros Costa Lins³, Moysés dos Santos Miranda³, Bruno Moura Monteiro^{1,2,*}

¹Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará – PPGCAN/UFPA, Castanhal, PA, Brasil

²Programa de pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia – ReptoAmazon/Ufra, Belém, PA, Brasil

³Programa de pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal do Pará – ReptoAmazon/UFPA, Castanhal, PA, Brasil

Resumo

A puberdade corresponde ao momento da primeira ovulação, que culmina com o desenvolvimento final dos órgãos e estruturas envolvidas no controle neuro-endócrino reprodutivo. É um fenômeno multifatorial com grande impacto na vida produtiva das futuras matrizes e em sua eficiência econômica, ocorrendo muitas interações entre os fatores internos e externos. A idade da puberdade está relacionada ao peso corporal, que possui grandes efeitos da genética do animal e sua interação com o ambiente, especialmente a nutrição e interação social com machos. Algumas espécies, como os bubalinos, sofrem efeito de outros elementos ambientais, como a luminosidade e o fotoperíodo. A puberdade novilhas búfalas ou bovinas pode ser adiantada por meio do emprego de biotécnicas: indução da puberdade ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Em ambas, os protocolos baseiam-se, principalmente, em aplicação de progestágeno associado com fonte de estradiol; mas a indução também pode ser realizada utilizando outros hormônios, como hormônio liberador de gonadotrofinas, prostaglandinas e gonadotrofina coriônica equina. No emprego da IATF, novilhas pré-púberes podem ser induzidas e inseminadas com outro protocolo de sincronização ou podem ser inseminadas com o mesmo protocolo de IATF, podendo aumentar as taxas de prenhez e diminuir os custos. Adiantando a puberdade, ocorre incremento na produção, melhorando a eficiência econômica da atividade pecuária.

Palavras-chave: puberdade, ovulação, prenhez.

Abstract

Puberty corresponds to the moment of the first ovulation, which culminates in the final development of the organs and structures involved in the neuro-endocrine control of reproduction. It is a multifactorial phenomenon with a great impact on the productive life of future matrices and their economic efficiency, with many interactions between internal and external factors. The age of puberty is related to body weight, which has great effects on the animal's genetics and its interaction with the environment, especially nutrition and social interaction with males. Some species, such as buffalo, are affected by other environmental elements, such as luminosity and photoperiod. Puberty in buffaloes and bovine heifers can be advanced through the use of biotechniques: induction of puberty or timed artificial insemination (TAI). In both, the protocols are mainly based on the application of progestogen associated with a source of estradiol; but induction can also be performed using other hormones, such as gonadotropin-releasing hormone, prostaglandins and equine chorionic gonadotropin. In the employment of the TAI, prepubertal heifers can be induced and inseminated with another synchronization protocol or they can be inseminated with the same TAI protocol, which can increase pregnancy rates and decrease costs. Advancing puberty, there is an increase in production, improving the economic efficiency of livestock activity.

Keywords: *puberty, ovulation, pregnancy.*

*Correspondência: brunomouramonteiro@hotmail.com

Recebido: 22/07/2020

Aceito: 15/07/2022



Introdução

Para fêmeas bovinas e bubalinas, a puberdade pode ser definida como o período em que se estabelece o ciclo estral com a primeira ovulação e subsequente formação de um corpo lúteo (Vale e Ribeiro, 2005). O momento e as condições do início da vida reprodutiva têm grande importância na eficiência econômica da atividade pecuária e na produtividade animal (Day e Nogueira, 2013).

A instauração da puberdade não é uma simples função da idade cronológica, mas sim um fenômeno multifatorial afetado por fatores internos e externos (Campanile *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2016). Os fatores internos envolvem a espécie, genética, crescimento, peso corporal e interações hormonais. Dentre os fatores externos cita-se a nutrição, interações sociais e fatores ambientais, como estação do ano, luminosidade, temperatura, umidade e precipitação pluviométrica (Foster e Hileman, 2015; D'Occhio *et al.*, 2020).

Para atingir a puberdade mais cedo, os animais podem ser selecionados para precocidade sexual e serem submetidos a manejos que os permitam expressar sua potencialidade genética perante as interações ambientais. O início da vida reprodutiva de novilhas pré-púberes pode ser estimulado com o fornecimento de uma alimentação adequada (Patterson *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 2014), aplicação da bioestimulação animal em lotes de fêmeas que não atingiram a puberdade (Oliveira *et al.*, 2009; Choudhary *et al.*, 2022), planejamento do nascimento para épocas que os animais irão atingir puberdade mais cedo (Senger, 2012), assim como a manipulação hormonal, tanto pela indução de cio como pela aplicação de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Freitas 2015; Sá Filho *et al.*, 2015; Souza *et al.* 2017; Lima *et al.*, 2020).

Tendo em vista o impacto da puberdade sobre a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, sobre a produtividade de rebanhos bovinos e bubalinos, esta revisão de literatura visa discutir alguns dos aspectos morfofisiológicos, endócrinos e moleculares que regulam o surgimento da puberdade de novilhas pré-púberes dessas espécies. Além disso, considerando as inúmeras estratégias de manejo que podem ser adotadas para antecipar a puberdade, também se tem como objetivo apontar como a manipulação hormonal pode adiantar a idade ao primeiro serviço, bem como viabilizar programas de melhoramento genético por meio da utilização da inseminação artificial de novilhas pré-púberes.

Fisiologia e endocrinologia da puberdade

O surgimento da puberdade na novilha bovina e bubalina corresponde ao momento da primeira ovulação e no qual os ciclos estrais têm início. No entanto, a puberdade não está associada apenas com o desenvolvimento anatômico completo do corpo, mas também é expressa sempre que o funcionamento fisiológico de algumas glândulas endócrinas se torna completo, associado com o suficiente desenvolvimento estrutural do trato reprodutivo feminino (Perry, 2016).

Na fêmea imatura, os pulsos de gonadotrofina pré-ovulatórios não ocorrem espontaneamente e, embora seja capaz de funcionar desde muito cedo, não ocorre até a puberdade. Esse bloqueio acontece devido o feedback negativo do estradiol (Gordon, 2002). Durante a transição da fase pré-pubere para a fase puberal ocorre uma redução pronunciada na sensibilidade à inibição da secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo estradiol. Como resultado, ocorre secreção de GnRH e o aumento na frequência do pulso de hormônio luteinizante (LH), o que interfere no processo da primeira ovulação (Cardoso *et al.*, 2018; Gordon, 2002). Esse pico característico do LH é um dos principais preditores do início da puberdade (Day *et al.*, 1984).

Importante para a consideração do controle de *feedback* da secreção de GnRH é que, com o estradiol perdendo sua eficácia como um potente agente de feedback negativo durante a transição puberal, uma vez iniciadas as ovulações, essa regulação de *feedback* é assumida pela progesterona, que faz sua primeira aparição com o surgimento do corpo lúteo (Gordon, 1997). Portanto, antes da idade da puberdade, o estradiol é extremamente eficaz na supressão da secreção pulsátil de LH, e perde a sua eficácia à medida que se aproxima o tempo da puberdade. A progesterona assume então o papel do principal controle de *feedback* inibitório da secreção de GnRH (Foster e Karsch, 1976). Durante a fase folicular, por 48 a 72 horas, a frequência de pulso do GnRH se torna mais rápida e um aumento sustentado na secreção basal de LH ocorre quando a frequência de pulsos de LH aumenta para mais de 1/hora. O aumento do estímulo de gonadotrofina leva um ou mais folículos ovarianos ao estágio pré-ovulatório e a produção de estradiol aumenta para níveis elevados para ativar o mecanismo de aumento de gonadotrofinas. A ovulação ocorre e um ou mais corpos lúteos, que começarão a produzir progesterona, são formados (Knobil, 2006).

Os ovários de bezerras apresentam evidências de atividade folicular muito antes do início da puberdade e do estabelecimento de ciclos estrais (Hopper *et al.*, 1993). Estudos relatados por Evans *et al.*



(1994a, b) mostraram que em bezerras com apenas duas semanas de idade, os folículos ovarianos crescem de forma semelhante a uma onda folicular do animal adulto. O surgimento de ondas de desenvolvimento folicular foi precedido por picos do hormônio folículo-estimulante (FSH) nas concentrações plasmáticas das bezerras nessa idade. Os mesmos autores especularam que o aumento precoce da secreção de gonadotrofina estimulou o desenvolvimento folicular, indicando um passo crítico inicial no desenvolvimento reprodutivo das novilhas.

Evans e Rawlings (1995) estudaram o efeito do tratamento com LH e FSH entre 8 e 12 semanas de idade em bezerras da raça Hereford. Os autores descobriram que este tratamento atrasou o início do estro em comparação com os animais do grupo Controle. Tais resultados enfatizam a importância do padrão correto de secreção de LH e FSH para a progressão normal de eventos no estabelecimento da puberdade.

Os folículos antrais estão presentes nos ovários bovinos em todos os estágios, desde antes do nascimento da bezerra até a idade avançada. Mesmo em bezerras muito jovens, os ovários são capazes de responder a gonadotrofinas exógenas, e ocasionalmente estes hormônios podem ser utilizados na recuperação de oócitos para produção de embriões. Estudos em superovulação (Armstrong, 1993; Stubbings *et al.*, 1993) mostraram que a resposta folicular dos ovários de bezerras à estimulação de FSH aumentou progressivamente entre 3 e 9 semanas de idade, e que os oócitos recuperados laparoscopicamente de tais folículos são capazes de produzir embriões e bezerros após a fertilização *in vitro*. No entanto, como mostrado por DUBY *et al.* (1996), embora um grande número de folículos possa se desenvolver em resposta às gonadotrofinas exógenas em bezerras e novilhas jovens, os oócitos que eles contêm aparentemente não possuem competência para se desenvolver, pelo menos até os animais atingirem 6-8 meses de idade.

Sabe-se que os padrões de crescimento e regressão dos folículos no período pré-púbere tardio e nos primeiros ciclos são notavelmente similares àqueles em novilhas cíclicas mais velhas (Hopper *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1994b). Adams *et al.* (1994) concluíram que os mecanismos que controlam os fenômenos bem ordenados de emergência de uma onda, seleção e regressão folicular, semelhantes aos das novilhas sexualmente maduras, eram evidentes em novilhas pré-púberes de 9 meses de idade.

O conhecimento exato dos mecanismos envolvidos na puberdade pode contribuir para uma melhor compreensão do problema da puberdade tardia, que se sabe ocorrer em bovinos (Knobil, 2006). Acredita-se que os principais componentes dos mecanismos endócrinos necessários para ciclos estrais normais em novilhas estejam presentes após cerca de 5 meses de idade. Nesse momento pode ser demonstrado que os mecanismos hipotalâmico-hipofisários são capazes de responder ao estradiol exógeno com uma liberação súbita de LH, que resulta em níveis sanguíneos dessa gonadotrofina similares aos requeridos para a ovulação.

A primeira ovulação na novilha é geralmente seguida por um curto ciclo (7,7 dias; Evans *et al.*, 1994a), que é seguido por um ciclo ovulatório de duração normal (20,3 dias). Essa sequência de eventos é semelhante à registrada na vaca durante o pós-parto.

Um potente estimulador das secreções de GnRH (Colledge, 2008; Smith, 2008) é a molécula kisspeptina (Kp), que atua diretamente nos neurônios de GnRH (Han *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.*, 2005). A Kp desempenha um papel importante no controle do eixo reprodutivo e parece desempenhar papel determinante no início da puberdade (Plant *et al.*, 2006; Roseweir e Millar, 2008). Estudos sugerem que a sinalização de Kp está envolvida no mecanismo central que regula o pulso de GnRH/LH, o pico pré-ovulatório e a ovulação (Macedo *et al.*, 2019).

Kadokawa *et al.* (2008) demonstraram que a administração de Kp-10 (Kp -decapeptídeo) por via intravenosa aumenta as concentrações na forma de picos de LH e GH (hormônio do crescimento) em novilhas pré-púberes da raça Holandês. Já Ahmed *et al.* (2009) compararam a utilização da Kp-10 por via intravenosa ou intramuscular, e observaram que as duas vias de administração resultaram em liberação de FSH, LH e GH em bovinos da raça *Japanese Black*.

Macedo *et al.* (2019) compararam a concentração de LH em *Bos taurus* (raça Holandês) e *Bos indicus* (raça Gir) após a administração de Kp por via intramuscular. Os autores observaram que todos os animais responderam ao tratamento de Kp, sendo que as fêmeas pré-púberes da raça Holandês obtiveram maior área sob a curva para LH e maior amplitude do pico de LH em comparação com as fêmeas pré-púberes da raça Gir. Os autores sugeriram que os efeitos da Kp provavelmente foram por sua ação sobre a hipófise e não pela estimulação hipotalâmica.

Fatores que influenciam no surgimento da puberdade

A idade em que as novilhas iniciam o ciclo estral regular está relacionada com os ganhos em peso corporal, do nascimento à puberdade. Todavia, é também determinada por um arranjo de variáveis



genéticas e ambientais. Por sua vez, a influência do ambiente na sequência dos eventos que levam à manifestação da puberdade é estabelecida largamente pelo *status* nutricional dos animais e pelos efeitos relacionados à sua taxa de crescimento e desenvolvimento corporal e trato reprodutivo (Patterson et al., 1992).

Com base nesse raciocínio, pode-se afirmar que a puberdade é um fenômeno de causa multifatorial, pois sofre influência da genética, nutrição, clima, fotoperíodo e o manejo a que os animais são submetidos (Campanile et al., 2009; Gupta et al., 2016), assim como da interação entre esses fatores. Por estes motivos, o corrente tópico discutirá cada fator separadamente.

Genética

Nas fêmeas, o início da puberdade não pode ser identificado somente por alterações fenotípicas. Por este motivo, buscaram-se associações de medidas de precocidade entre machos e fêmeas. Estudos mostram que maiores medidas de perímetro escrotal (PE) em touros estão associadas à maior precocidade reprodutiva e menor idade ao primeiro parto (IPP) em suas filhas (Pereira et al., 2001; Pereira et al., 2002). O PE apresenta correlação genética alta e positiva com a idade ao primeiro parto de fêmeas (Silva et al., 2000).

A herdabilidade de características de fertilidade de fêmeas é, em geral, de magnitude baixa. Para a raça Canchim, as estimativas de herdabilidade da IPP variam de -0,03 a 0,22 (Oliveira Filho et al., 1979; Barbosa, 1991). Para animais zebuínos, a amplitude de variação de 0,01 a 0,46 (Mariante, 1978; Martins Filho e Lôbo, 1991; Gressler et al., 2000), sugerindo que em alguns casos a característica responderia bem à seleção. No caso da idade ao segundo parto (ISP), a estimativa de herdabilidade foi de 0,34 (Barbosa, 1991), indicando que algum progresso genético pode ser obtido pela seleção.

Toelle e Robison (1985) realizaram um estudo utilizando machos e fêmeas aparentados para estimar a correlação genética entre características reprodutivas. Os autores demonstraram que a seleção para tamanho testicular dirigiu o melhoramento de fêmeas para melhores características reprodutivas, tais como prenhez, idade à primeira cobertura e idade ao primeiro parto. Na raça Nelore, Martins Filho e Lôbo (1991) encontraram uma associação favorável entre o perímetro escrotal e a reprodução da fêmea, em especial a idade à puberdade nas filhas, sendo que a herdabilidade para essa característica foi de 0,34.

A seleção para PE possibilita o melhoramento genético da reprodução do rebanho como um todo (Meacham e Notter, 1987). Assim, rebanhos detentores de elevada precocidade sexual e fertilidade possuem maior probabilidade e disponibilidade de animais, tanto para venda como para seleção, permitindo maior intensidade seletiva e, conseqüentemente, progressos genéticos mais elevados em menor tempo (Pereira, 2008).

Estudos mostraram que o progresso na seleção para precocidade poderia ser bem maior se utilizássemos a idade ao primeiro parto ao invés do perímetro escrotal (Pires, 2010). A idade ao primeiro parto parece ser uma característica promissora para se avaliar a precocidade de novilhas. Essa característica apresenta-se com herdabilidade bastante variável dependendo da interpretação dessa característica. Por exemplo, os valores encontrados na literatura de herdabilidade para a característica idade ao primeiro parto variando de 0,12 (Silva et al., 2005) a 0,57 (Eler et al., 2002). Essa variação deve-se ao fato de que quando a herdabilidade é de 0,57, as novilhas foram expostas ao touro, já aos 14 meses de idade, No entanto, quando a herdabilidade é de 0,12, as novilhas foram expostas ao touro somente aos 24 meses de idade.

Nutrição

As relações entre alimentação, crescimento e reprodução são de grande interesse nas espécies e raças, com a finalidade de aperfeiçoar as diferentes etapas do manejo da fazenda. A nutrição possui grande importância no desenvolvimento reprodutivo de novilhas, desde o desenvolvimento fetal, no ganho de peso pós natal e condição corporal, antes do desmame e até a puberdade (D'Occhio et al., 2019).

A nutrição regula a proporção de tecido adiposo e músculo e determina homeostase metabólica, com participação de hormônios metabólicos, como a leptina, entre os principais reguladores da função reprodutiva em fêmeas. Além disso, a nutrição também atua no fornecimento de substratos para folículos ovarianos, oócitos e embriões (D'Occhio et al., 2019).

A leptina é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos (Friedman e Halaas, 1998; Houseknecht e Portocarrero, 1998) e que age sobre o sistema nervoso central sinalizando sobre o estado nutricional, regulando assim o consumo alimentar e o balanço energético (Ehrhardt et al., 2000).



Além de ser expressa no tecido adiposo branco (Chilliard *et al.*, 2001), a leptina é expressa em outros tecidos, como hipotálamo (Morash *et al.*, 1999), hipófise (Jin *et al.*, 1999; Yonekura *et al.*, 2003), sinciciotrofoblasto (Masuzaki *et al.*, 1997), tecidos fetais (Ehrhardt *et al.*, 2002; Yuen *et al.*, 2002), glândula mamária (Chelikani *et al.*, 2003; Leury *et al.*, 2003), epitélio gástrico (Bado *et al.*, 1998) e musculatura esquelética (Wang *et al.*, 1998). Particularmente sobre o hipotálamo e a hipófise, esses locais são pontos-chave para o controle do apetite, reprodução e crescimento (Di Palo *et al.*, 2005).

Os níveis de leptina circulantes estão diretamente relacionados com a quantidade de RNAm para leptina no tecido adiposo (Maffei *et al.*, 1995) e suas concentrações podem variar de acordo com a distribuição de gordura, o que pode refletir na quantidade de leptina produzida (Delavaud *et al.*, 2002). Já foram relatadas diferenças nas concentrações de leptina entre animais de corte e leite (Block *et al.*, 2001; Delavaud *et al.*, 2002).

A proteína leptina regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo, além de exercer papel sinalizador e modulador do estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos (Ceddia *et al.*, 1998). Sugeriu-se que a leptina poderia ser um sinal importante para a puberdade (Chehab *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 1998). Além disso, a leptina é também sintetizada nos oócitos, células da granulosa (Cioffi *et al.*, 1997) e tecidos placentários (Masuzaki *et al.*, 1997).

Estudos realizados em rebanhos bovinos têm demonstrado que a expressão gênica e a concentração da leptina circulante são afetadas pelo fluxo de nutrientes e associadas com alterações nos níveis séricos de insulina, de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e de LH em novilhas na fase pré-púbere (Amstalden *et al.*, 2000).

A relação da leptina com a puberdade de novilhas mestiças de raças leiteiras foi verificada por Garcia *et al.* (2002) em um experimento onde tanto a leptina circulante quanto a expressão do gene da leptina aumentaram significativamente com a aproximação da puberdade, embora os valores observados para estas duas variáveis não terem sido correlacionados. Ainda nesse estudo, aumentos no peso vivo corporal e na concentração de IGF-1 no soro dessas fêmeas foram associados aos níveis de leptina no soro e com a expressão gênica.

Alguns estudos relacionaram a concentração de leptina com o início da puberdade (Garcia *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002), acreditando-se que esse hormônio seria um provável sinal metabólico que comunicaria o estado nutricional à reprodução. Segundo Halaas *et al.* (1995), a leptina é sintetizada e secretada em resposta ao aumento do metabolismo. Assim, os efeitos da leptina sobre a reprodução são consequência da disponibilidade de reservas energéticas, já que a leptina atuaria enviando sinais a regiões do cérebro sensíveis à glicose, que influenciariam a secreção de GnRH (Bronson e Manning, 1991; Amstalden *et al.*, 2000).

O peso do animal pode explicar uma série de variações associadas ao início da puberdade (Garcia *et al.*, 2002), tendo correlação com a concentração de leptina circulante (Ehrhardt *et al.*, 2000). Concentrações séricas de leptina aumentaram cerca de duas semanas antes da primeira ovulação, que marcou o início da puberdade em novilhas (Díaz-Torga *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2002). Ehrhardt *et al.* (2000), ao realizarem radioimunoensaio (RIA) específico para a quantificação de leptina bovina, observaram concentração elevada de leptina em bezerros alimentados adequadamente na fase de crescimento e encontraram relação positiva entre a concentração de leptina plasmática e a massa gorda corporal. Segundo Beltran (2007), a leptina participa do processo da puberdade de novilhas da raça Nelore juntamente com o peso, e o IGF-I se mostrou determinante no estabelecimento de prenhez.

Há ampla evidência para mostrar o profundo efeito da nutrição na idade à puberdade e na fertilidade em novilhas bovinas. As novilhas alimentadas para ganhar 453 g/dia (dos 7 aos 12 meses de idade) mostraram fertilidade satisfatória, enquanto o aumento do ganho de peso para 680 g/dia não se justificou em termos de melhora na taxa de prenhez. Em contrapartida, foi demonstrado um efeito negativo marcante sobre a idade na puberdade de novilhas com ganho de peso inferior a 226 g/dia (Wiltbank *et al.*, 1966).

Em búfalos, um dos principais fatores que influencia a idade da puberdade também é o nível nutricional (Borghese *et al.*, 1993, 1994, 1996; Terzano *et al.*, 1996). Borghese *et al.* (1997) e Terzano *et al.* (2007) demonstraram que animais que apresentam ganho médio diário de no mínimo 600 g/dia não têm atraso na idade da puberdade, tanto em sistemas de pastejo ou criação intensiva. Búfalas geralmente alcançam a puberdade quando atingem aproximadamente 60% do peso adulto das fêmeas do rebanho (250 a 400 kg), mas a idade na qual ocorre o desencadeamento da puberdade pode ser altamente variável podendo ocorrer entre os 18 a 46 meses (Drost, 2007).



Na maioria dos países europeus e do Oriente Médio a idade à puberdade da búfala é adiada porque os requisitos nutricionais não são atingidos. A puberdade tardia é um dos principais fatores que contribuem para as perdas econômicas. A má nutrição provoca ciclos estrais anormais, reduzindo a taxa de concepção e reduzindo o peso ao nascimento (Borghese *et al.*, 2011). Nas condições amazônicas, as novilhas da raça Murrah, mantidas em níveis nutricionais satisfatórios podem atingir a puberdade entre os 13 a 18 meses (Ribeiro, 2007).

Com base nas avaliações das concentrações de progesterona, verificou-se que as novilhas Murrah x Mediterrâneas criadas em pastagens *Brachiaria humidicola*, atingiram a maturidade sexual entre 2,1 anos e para novilhas Carabao 3,3 anos. No entanto, em níveis nutricionais e manejo ideal, a puberdade pode ser atingida aos 16 meses de idade. Ainda assim, as novilhas Carabao são menos precoces e só atingem a puberdade após os 24 meses de idade (Vale *et al.*, 1990; Vale, 1994).

Vale (2000) reportou que a puberdade foi atingida em novilhas da raça Murrah com a idade média de 17,6 (14,5-20) meses, com um peso corporal médio de 391 ± 33 (365-444) kg. Para o autor, é possível antecipar a idade à puberdade através da pressão de seleção e o manejo adequado dos animais por todas as fases de sua vida. Este afirma ainda que devem-se levar em conta as questões sanitárias, além de uma alimentação balanceada. Nas condições do trópico úmido amazônico, animais criados em regime semi-extensivo de pastagem de boa qualidade e com suplementação alimentar de silagem, podem atingir a puberdade a partir de 13 meses de idade, com peso corporal aproximado de 350 kg.

Em uma criação de regime extensivo onde as técnicas de manejo e práticas sanitárias não são adotadas corretamente, além de uma alimentação escassa e de baixa qualidade no período seco, existe um efeito negativo marcante no estabelecimento da puberdade desses animais. Novilhas bubalinas mantidas sob as condições de manejo extensivo sem os devidos cuidados profiláticos e de manejo atingem a puberdade com uma idade nunca inferior a 30 meses (Vale *et al.*, 1990).

Bubalinos têm o potencial de ganhar 400 a 800 g/dia nos primeiros quatro a seis meses de idade, e podem atingir os 300 a 450 kg de peso corporal, adequado para reprodução aos 24 meses de idade. No entanto, na maioria dos partos de búfalas de raças leiteiras ocorre em quatro a seis anos de idade. Isto é principalmente devido a uma oferta inadequada de alimentos e nutrientes durante a fase de crescimento (Borghese, 2005).

Estação do ano

Em bovinos, há evidências de que a idade na puberdade é influenciada pela estação do nascimento. Por exemplo, as novilhas nascidas no outono tendem a atingir a puberdade mais cedo do que as nascidas na primavera (Senger, 2012).

Roy *et al.* (1980) mencionaram vários fatores que afetaram a puberdade e produziram evidências de que bezerros da raça Holandês nascidos no Reino Unido durante o período de aumento da duração do dia (primavera) atingiram a puberdade cerca de 2 meses mais cedo do que os nascidos em outras épocas.

Segundo Schillo *et al.* (1992), lidando com novilhas de corte nos EUA, as condições sazonais dos períodos pré-natais precoces (nascimento até o sexto mês do ano) e tardios (6-12 meses) podem influenciar o tempo de início da puberdade. Eles observaram que as novilhas nascidas no outono atingem a puberdade em idades mais jovens do que as nascidas na primavera.

Vale ressaltar que a maioria dos achados descritos até aqui são realidade no clima temperado do hemisfério norte, onde apresentam estações do ano em épocas e condições bem diferentes do Brasil. No entanto, não existem muitos relatos em nosso país que possam ser comparados a estes dados. Outro fator que dificulta essa comparação é que o nosso sistema de produção pecuário é baseado principalmente no regime de chuvas do verão e do inverno, assim como a variação de temperatura entre essas estações do ano.

Nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, os bezerros mais pesados nascem entre julho a dezembro (Bocchi *et al.*, 2004). A estação de parição geralmente ocorre entre as estações de verão e primavera, quando ocorre maior disponibilidade de forragem (Sá Filho *et al.*, 2012), com forragem de maior qualidade, o que provoca um desmame de bezerros mais pesados (Oliveira *et al.*, 2006). O peso ao desmame é muito importante, pois novilhas de alto potencial reprodutivo desmamam mais pesadas, necessitando de um menor peso adicional para alcançar a puberdade (Sá Filho *et al.*, 2012).

Para bubalinos, bezerros que nascem no período de alta estação de parto, que ocorre entre agosto a janeiro na Índia, são mais pesados entre 7 a 12 meses (Das *et al.*, 2004). Além disso, novilhas Murrah búlgaras que nascem no outono (setembro a novembro) e verão (junho a agosto) apresentam menor idade ao primeiro parto (Penchev *et al.*, 2014).



Luminosidade

Informações sobre a duração do dia (horas de luz *versus* horas de escuridão) são retransmitidas da retina através do trato retino-hipotalâmico por meio dos núcleos supraquiasmáticos, que fornecem informações circadianas. A informação nervosa então prossegue via núcleos paraventriculares e depois por via multissináptica envolvendo os gânglios cervicais superiores até a glândula pineal, que regula a produção de melatonina. Assim, o meio ambiente no ciclo claro-escuro arrasta o ritmo de melatonina baseado no ciclo circadiano de tal forma que a melatonina é apenas secretada durante a fase escura do fotoperíodo (Karsch *et al.*, 1983). Longos dias reduzem o período de alta secreção de melatonina, enquanto dias curtos induzem uma longa secreção desse hormônio (Mori e Okamura, 1986).

A espécie bubalina, que é poliéstrica sazonal, é sensível ao fotoperíodo e a melatonina é o hormônio responsável por sinalizar a alternância claro/escuro em búfalos, controlando o início ou o término da atividade ovariana cíclica (Zicarelli, 1994). Desse modo, os hormônios sexuais são sintetizados e liberados através do eixo hipotálamo-adenohipófise de acordo com as variações de luminosidade diária ao longo do ano (Malpaux *et al.*, 2001; Phogat *et al.*, 2016).

Os melhores indicativos de sensibilidade ao fotoperíodo nas búfalas podem ser aferidos a partir dos níveis de melatonina e seu aumento na ausência de luz (Parmeggiani *et al.*, 1993). A maior duração da luminosidade reflete com o número menor de búfalas demonstrando comportamento de estro (Singh *et al.*, 2000). Portanto, a regulação sazonal da atividade ovariana de búfalas está diretamente relacionada ao hormônio melatonina que tem papel fundamental sobre a regulação da liberação de GnRH (Zicarelli, 1997).

Esses padrões de melatonina formam a base de um registro neuroendócrino da experiência do fotoperíodo que modula a frequência da secreção de GnRH. O ciclo anual de alterações do fotoperíodo influencia o ritmo pineal circadiano para influenciar os ritmos cerebrais ultradianos que modulam a produção do neuropeptídeo GnRH que dá origem ao padrão de LH ao qual o ovário está exposto (Knobil, 2006).

Diferentemente dos búfalos, o funcionamento ovariano dos bovinos não é sensível ao efeito da estação do ano (Borges *et al.*, 2004). Em contrapartida, o anestro e a diminuição da fertilidade de fêmeas bovinas, em alguns períodos do ano, sofrem substancialmente mais influência da nutrição do que da variação de luminosidade (Randel, 1994). É possível que o processo de domesticação possa ter atenuado ou até mesmo suprimido as expressões fisiológicas da sazonalidade nos bovinos (Thiéry *et al.*, 2002).

Efeito macho

Como temos discutido, fatores externos têm uma influência significativa sobre o início da puberdade. Em geral, a informação ambiental que influencia o início da puberdade é percebida pelos neurônios sensoriais dos sistemas ótico e olfativo (Senger, 2012).

Segundo Rekwot *et al.* (2000), os feromônios são capazes de induzir respostas comportamentais imediatas ou mudanças fisiológicas, tais como indução e sincronização de estro e a aceleração da puberdade nas fêmeas. Essas mudanças ocorrem em resposta ao feromônio liberado pelo macho que age no hipotálamo das fêmeas estimulando a liberação de GnRH, resultando na secreção de LH (Izard e Vandenberg, 1982).

A presença de feromônios androgênicos pode induzir na novilha aumento da frequência dos pulsos de LH (Rekwot *et al.*, 2001), fato que possui alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,88$) para o início da puberdade (Kinder *et al.*, 1987). O aumento da sensibilidade do *feedback* positivo ao estradiol desencadeando maior liberação do GnRH e o aumento da sensibilidade ovariana ao LH, através da presença de um maior número de receptores de LH nas células foliculares, são outras possíveis alterações que podem ocorrer justificando o efeito do macho no desencadeamento da puberdade (Rekwot *et al.*, 2001).

Foi relatado que a presença de um touro vasectomizado acelera o início da puberdade em novilhas (Rekwot *et al.*, 2001), e Roberson *et al.* (1991) demonstraram que um maior número de novilhas expostas a touros entra na puberdade mais cedo do que as novilhas não expostas (61,8% vs. 45,4%). Ainda, observou-se que novilhas expostas ao touro atingiram a puberdade três meses mais cedo do que novilhas não expostas, porém foi necessário tempo mínimo efetivo de 2 a 3 meses de exposição das novilhas aos touros para que houvesse efeitos significativos sobre a puberdade (Spire, 1997).

Pesquisadores de Nebraska também mostraram que os touros aceleram o início da puberdade em novilhas de corte. No entanto, houve uma interação entre a taxa de crescimento e a exposição ao touro. Por exemplo, novilhas com alta taxa de crescimento (794 g/dia) e novilhas com taxa moderada de crescimento



(635 g/dia) quando expostas a um touro por cerca de 6 meses, atingiram a puberdade em cerca de 375 dias e 422 dias, respectivamente (Senger, 2012).

Portanto, a bioestimulação pode ser útil para a indução de puberdade em machos e fêmeas, visto que novilhas expostas a touros atingiram a puberdade mais cedo que novilhas que não foram expostas a touros. Porém, vale ressaltar que o sistema de criação que opta por separar machos de fêmeas pode acabar suprimindo o “efeito macho” presente nos grupos mistos de animais. A formação de grupos mistos, e consequente exposição da fêmea ao macho em períodos estratégicos, pode ser importante para estimular o desempenho reprodutivo (Nogueira, 2006).

Os relatos sobre o efeito macho em búfalas são escassos. Entretanto, é descrito que o efeito da presença do macho contribui para ativação ovariana de búfalas da raça Nili-Ravi ($n = 20$) no pós-parto, fora da estação reprodutiva (Zaidi e Anwar, 2018). Mas, em linhas gerais, apesar dos efeitos benéficos descritos na literatura, as vantagens do efeito macho parecem não sobrepor às desvantagens do uso de touros, além do estritamente necessário, na fazenda. Talvez por isso haja tão poucos estudos sobre o assunto. Nossa experiência sugere que os custos de compra de touro, a necessidade de realização de cirurgia para preparo de rufiões, assim como os inúmeros problemas relacionados aos números de touros na fazenda, no que tange às brigas entre machos, traumatismos em fêmeas ou, fatidicamente, acidentes com funcionários, não compensam que se tenha touros extra para realizar a bioestimulação.

Biotécnicas aplicadas à indução da puberdade em novilhas pré-púberes

Indução da puberdade de novilhas bovinas

O estímulo para a antecipação da puberdade nada mais é do que a aplicação de um tratamento de sincronização de estro, empregando progestágeno, estrógeno e/ou gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Lima *et al.*, 2020), suficiente para ativar o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e iniciar a atividade de ciclicidade ovariana, como ocorre em muitos casos quando aplicado em vacas pós-parto (Gordon, 2002).

Embora ainda exista necessidade de maiores esclarecimentos sobre alguns mecanismos endócrinos envolvidos na puberdade, sabe-se que em meados da década de 1970 já existia embasamento suficiente para um tratamento capaz de induzir estro em bovinos pré-púberes (Gonzalez-Padilla *et al.*, 1975). O protocolo consistia num implante auricular de 9 dias (6 mg de norgestomet) com a aplicação de estrógeno mais progestágeno no momento da implantação (3 mg de valerato de estradiol + 3 mg de norgestomet). Os resultados foram confirmados por outros pesquisadores à época (Burfening, 1979; Short *et al.*, 1976). A idade e o peso das novilhas foram considerados importantes para determinar o sucesso do tratamento de indução.

Dependendo da condição de criação do rebanho, os tratamentos com progestágenos podem resultar em aproximadamente 90% das novilhas de corte pré-púberes entrando em cio e mais de 50% ficando gestantes em até 5 dias após a remoção do implante. Um tratamento empregando apenas a progesterona foi eficaz na estimulação do cio em novilhas pré-púberes (Sheffield e Ellicott, 1982). No entanto, há estudos mostrando que a resposta ao tratamento com o implante de norgestomet pode ser variável, com alguma proporção de animais retornando à sua condição de anestro pré-puberal após um ciclo (Tanaka *et al.*, 1995). Claramente, a idade e outros fatores podem influenciar a eficácia de um tratamento de indução.

Um dos tratamentos mais simples foi aquele empregado por Schoppee *et al.* (1995) que realizaram a indução da puberdade precoce em novilhas de Angus com 8 meses de idade, usando uma única injeção de estradiol-17B (500 mg por aplicação IM). A idade média na puberdade em novilhas tratadas foi significativamente menor do que nas fêmeas do grupo Controle (249 *versus* 271 dias).

Polat *et al.* (2009) demonstraram que o PRID (dispositivo intravaginal liberador de progesterona) contendo 1,55 g de progesterona e 10 mg de benzoato de estradiol é efetivo para induzir a ciclicidade em novilhas tardias. O experimento utilizou 33 novilhas mestiças (Holândes x Pardo Suíço) com idade entre 20 e 30 meses que não apresentavam ciclicidade. Amostras de sangue coletadas após o tratamento determinaram que 93,9% das novilhas apresentaram ciclicidade induzida (níveis plasmáticos de progesterona $> 1,0$ ng/mL).

Madgwick *et al.* (2005) trabalharam para conhecer o efeito do GnRH na puberdade sexual em bezerras bovinas de 4 a 8 semanas de idade e concluíram que as novilhas tratadas com GnRH atingiram a puberdade mais cedo do que as novilhas controle ($56,8 \pm 1,7$ vs. $62,8 \pm 2,4$ semanas) com maior nível de hormônio LH ($0,58 \pm 0,06$ ng/ml vs. $0,41 \pm 0,02$ ng/mL) e maior número de pulsos de LH ($2,0 \pm 0,19$ vs. $1,32 \pm 0,12$ pulsos por 10 h.) do que o Controle. Em bezerras, um aumento transitório precoce nas



concentrações circulantes de LH está associado ao desenvolvimento folicular precoce e acredita-se que isso regule o tempo da puberdade. O ganho de peso corporal foi maior nas bezerras tratadas com GnRH em relação às Controle ($P < 0,05$), e a taxa de ganho de peso mostrou-se uma co-variável significativa dentro da idade da puberdade (Madgwick *et al.*, 2005).

O efeito da idade e da taxa de crescimento na indução da puberdade em novilhas de corte e tratamento com progestágeno (implante de norgestomet a 10 dias) foi estudado por Hall *et al.* (1994). Eles concluíram que o tratamento com progestágeno induziu a puberdade mais imediata em novilhas mais velhas, pelo menos em parte devido ao aumento da secreção de LH induzida pelo progestágeno. Ainda, várias formas de tratamento com progestágeno sobre o crescimento folicular em novilhas de corte pré-púberes foram estudadas por St Clair *et al.* (1995), onde observaram que tal tratamento aparentemente estimulou o crescimento folicular sem afetar a secreção de LH.

Também é possível empregar o tratamento de progestágenos associado a prostaglandinas como método de estimular atividades reprodutivas mais precoces. Um tratamento com acetato de melengestrol (MGA) mais prostaglandina foi empregado por Jaeger *et al.* (1992) para induzir a puberdade e o estro sincronizado e para permitir que uma maior porcentagem de novilhas de corte ficassem gestantes no início da estação reprodutiva (49% *versus* 14%). Neste estudo, as novilhas foram tratadas com 0,5 mg de MGA diariamente por 14 dias e uma dose de 25 mg de PGF, administrada 17 dias após a última administração de MGA.

Outro estudo avaliou o impacto da administração de acetato de melengestrol (MGA) sobre as respostas ovulatórias de novilhas púberes e pré-púberes (Martins *et al.*, 2015). Após cada novilha receber 0,5 mg/d de MGA ao longo de 14 dias, não foram encontradas diferenças nas respostas ovulatórias 10 dias após o fim da administração do MGA (púbere = 46,7% vs. pré-púbere = 53,3%; $P = 0,72$).

Freitas (2015) utilizou novilhas pré-púberes que foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais: Indução (dispositivo liberador de progesterona usado durante 10 dias mais 0,6 mg de cipionato de estradiol (CE) no momento da retirada) e Controle. Doze dias após o final do protocolo de indução de ciclicidade (Dia 0) todas as fêmeas foram submetidas a protocolo de sincronização para IATF. As novilhas do grupo Indução tiveram maior taxa de ciclicidade (75,2%) no momento do início do protocolo de IATF (Dia 0) em relação ao controle (7,8%).

O uso de CIDR (dispositivo intravaginal liberador de progesterona) de quarto uso (previamente utilizado em três protocolos de IATF durante 8 dias em cada) durante 12 dias para indução de puberdade também já foi descrito (Rodrigues *et al.*, 2013), e a adição de eCG e/ou CE na remoção de CIDR induzem a puberdade com eficiência em novilhas da raça Nelore. Altas taxas de indução também foram observadas quando se comparou o intervalo entre o fim do protocolo de indução e o início do protocolo de IATF (10, 12 ou 14 dias) (Rodrigues *et al.*, 2014). Nesse estudo, os autores observaram que não houve diferença na taxa de indução (média de 88,4%) entre os tratamentos, podendo, portanto, ser utilizado somente por 10 dias.

Lima *et al.* (2020) realizaram indução em novilhas pré-púberes com um protocolo à base de estradiol e com uma única dose (150mg) de progesterona injetável de ação prolongada (iP4). Após 12 dias, as fêmeas foram submetidas a um protocolo à base de progesterona (implante), estradiol, prostaglandina e GnRH. A indução estimulou o desenvolvimento uterino, crescimento folicular, estro, ovulação e prenhez em novilhas pré-púberes, de modo que houve tendência em maior taxa de prenhez no grupo iP4 (46% vs. 38,3; $p = 0,07$). Desse modo, os autores concluíram que a indução com injeção de P4 de ação prolongada é eficaz para acelerar a puberdade e aumentar o número de novilhas maduras no início de um programa de IATF.

Indução da puberdade de novilhas búfalas

Assim como em bovinos, a simulação das alterações hormonais que ocorrem em torno da puberdade pode induzir a ovulação em novilhas búfalas. Vários experimentos foram realizados para esse fim, no entanto em muito menor quantidade do que em bovinos (Andurkar e Kadu, 1995; Zicarelli *et al.*, 1997).

Embora o tratamento hormonal tenha um preço elevado, esta opção de manejo pode ser sugerida em novilhas búfalas tardias que tiveram bom manejo e boa alimentação em condições de campo (Naidu *et al.*, 2009). Gupta *et al.* (2016) relataram que a suplementação hormonal é útil para reduzir a idade de maturidade sexual no bovino e também no búfalo.

O uso do PRID em conjunto com o tratamento com eCG é capaz de induzir o estro fértil em



novilhas búfalas em anestro (Barile *et al.*, 2001; Pacelli *et al.*, 2001). Isso tem um impacto econômico na produção de búfalos, já que uma maior proporção de novilhas pode ser introduzida na reprodução com uma idade inferior. O tratamento com PRID aumentou a proporção de novilhas búfalas que se tornaram cíclicas em 60 dias a partir do início do tratamento. Além disso, os animais tratados tiveram uma taxa de concepção maior em comparação aos Controle (65,0% vs 28,2% , Barile *et al.*, 2001; 66,6% vs 33,3%, Pacelli *et al.*, 2001). Não houve diferença estatística no número de animais que se tornaram cíclicos em relação à dose de 1.000 UI e 750 UI de eCG utilizado nos tratamentos (Pacelli *et al.*, 2001).

Saini *et al.* (1988), usando o PRID associado com eCG para induzir o estro em novilhas búfalas em anestro, demonstraram que todos os animais do grupo Indução expressaram estro, enquanto nenhum animal do grupo Controle apresentou estro. Esses autores argumentaram que sinais de estro mais evidentes e uma melhor taxa de concepção foram obtidos quando o eCG foi usado com o PRID, já que o tratamento com PRID sozinho não induziu um estro fértil. Andurkar e Kadu (1995), usando um CIDR associado com o uso de PGF2 α (prostaglandina) e eCG, induziram o estro em búfalas em anestro (vacas e novilhas) e encontraram melhor fertilidade em um tratamento a longo prazo (12 dias) do que um de curto prazo (8 dias).

Abdoon *et al.* (1994), estudando o efeito do implante auricular contendo Norgestomet (Synchromate B) + eCG no tratamento de novilhas búfalas tardias (com 22 meses de idade com peso corporal entre 240-280 kg), revelaram que 83,3% (5/6) das novilhas evidenciaram o estro após $13,20 \pm 3,63$ dias. Eles concluíram que o implante auricular e a administração de eCG induzem o estro ovulatório em novilhas bubalinas.

Naidu *et al.* (2009) realizaram um estudo com novilhas búfalas da raça Murrah com idade avançada (entre 4 e 5 anos) em anestro e que não apresentavam anormalidades genitais. As novilhas tratadas com o análogo de GnRH (G3) registraram as maiores taxas de estro, seguidas das que receberam suplementação mineral (G2), depois das que receberam somente massagem de útero e ovários (G1) seguidas do Controle (G4).

Também foi estudado o uso de implantes de melatonina em novilhas búfalas durante anestro de verão (Ghuman *et al.*, 2008). Os autores apresentaram que com o aplicação de implantes de melatonina, os folículos pré-ovulatórios de novilhas em anestro de verão podem ser ovulados e conseqüentemente retomar a ciclicidade ovariana nesses animais.

Halder e Prakash (2006) trabalharam com novilhas búfalas da raça Murrah com a administração de 10 μg / 100 kg de bGRF (fator de liberação de hormônio de crescimento bovino) por via intravenosa e apresentaram que o bGRF teve um efeito significativo no peso corporal, concentrações plasmáticas de progesterona e início da puberdade. A administração de bGRF exógeno aumentou a concentração plasmática de GH no grupo tratado sobre o grupo Controle, bem como durante o período pré-púbere. As búfalas tratadas com bGRF atingiram a puberdade 58,5 dias antes do que as búfalas do grupo Controle. O dia em que a progesterona plasmática foi superior a 1,0 ng/mL durante três coletas consecutivas foi definido como o dia da puberdade.

Darweish *et al.* (2016) realizaram um estudo com novilhas bubalinas pré-púberes utilizando rbST e GnRH para induzir a puberdade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, grupo tratado com rbST e GnRH (G1, n = 10); Grupo tratado apenas com GnRH (G2, n = 10) e Controle (G3, n = 8). A porcentagem das novilhas bubalinas que atingiram a puberdade foi mais alta no G1 (100%) em comparação com o G2 (40%) ou G3 (25%). Os autores concluíram que a maior taxa de puberdade foi alcançada nas novilhas búfalas quando a dose de rbST foi administrada 3 dias antes da dose de GnRH.

Kaliannan *et al.* (2018) realizaram um experimento com quarenta novilhas búfalo-púberes e pré-púberes, mas sem distinguir quantas fêmeas em cada categoria, foram distribuídas em quatro grupos experimentais, em num fatorial 2 x 2, utilizando a suplementação mineral e o protocolo Ovsynch para verificar as taxas de ovulação e prenhez. As taxas de ovulação e prenhez foram semelhantes entre os grupos tratados e o Controle.

Carvalho (2021) realizou indução em novilhas bubalinas pré-púberes com protocolo à base de estradiol e progesterona (implante de 4^o uso), com duração de 10 dias. Após esse período, dividiu-se as fêmeas em três grupos, intervalo de 12 (Indução12) ou de 45 dias (Indução45) entre a indução e o protocolo de IATF, e o grupo controle. As novilhas possuíam no mínimo 270 kg e idade entre 12 a 16 meses. Houve maior taxa de prenhez ($p < 0,05$) para os grupos avaliados: Indução12 – 44,2%^a; Indução45 – 42,2%^{ab} e controle 21,8%^c ($p < 0,05$). Desse modo, o grupo Indução12 apresentou melhor taxa de prenhez, além de contribuir para melhor aproveitamento dessas fêmeas, pois antecipa o momento da concepção na estação de monta e na parição.



Uso da IATF para induzir a puberdade de novilhas pré-púberes

Além dos protocolos de indução da puberdade, há relatos na literatura da utilização de protocolos de IATF à base de progesterona e estradiol para duas finalidades com o mesmo protocolo. Programas de IATF em novilhas pré-púberes têm a finalidade de induzir a ciclicidade e já garantir um serviço por meio de uma IA.

Silveira *et al.* (2014) compararam as taxas de prenhez entre novilhas pré-púberes após monta natural ou submetidas à IATF e novilhas púberes submetidas à IATF. As taxas de prenhez foram respectivamente: 20,1%^c, 37,0%^b e 48,5%^a ($P < 0,05$). Em conclusão, novilhas pré-púberes e púberes submetidas à IATF apresentaram melhores taxas de prenhez do que fêmeas pré-púberes expostas a monta natural. Ademais, o protocolo à base de progesterona e estradiol foi capaz de sincronizar o estro e induzir uma ovulação fértil nas novilhas pré-púberes, assim como das fêmeas púberes.

Freitas (2015) realizou um experimento utilizando novilhas zebuínas pré-púberes para avaliar a taxa de prenhez com animais que receberam ou não protocolos de indução da puberdade previamente ao protocolo de IATF à base de progesterona e estradiol. O autor concluiu que não houve diferença na taxa de prenhez entre animais previamente induzidos ou não, ou seja, o protocolo de IATF foi capaz de induzir a puberdade e garantir um serviço fértil.

Souza *et al.* (2017) compararam as taxas de prenhez à IATF, à IA convencional e do repasse com o touro entre novilhas pré-púberes e púberes. Os resultados de prenhez para as novilhas pré-púberes e púberes foram respectivamente: IATF - 29,2% e 37,2% ($P > 0,05$); IA convencional - 13,0% e 33,9% ($P < 0,05$); repasse com touros - 36,2% e 35,9% ($P > 0,05$). Ao final da estação de monta a taxa final de prenhez nas novilhas pré-púbere e púberes foi de 60,7% e 73,4% ($P = 0,06$).

Guimarães (2020) submeteu novilhas búfalas pré-púberes a um protocolo de IATF a base de progesterona, estrógenos e eCG para verificar a taxa de indução de puberdade e taxa de prenhez após a inseminação. Foi possível observar que 68% dos animais responderam ao protocolo se tornando cíclicos e se obteve uma taxa de prenhez de 22,7%.

Freitas *et al.* (2021) avaliaram a relação entre maturação corporal na puberdade após IATF em novilhas: escore de condição corporal, altura da cernelha, profundidade do peito, espessura de gordura subcutânea e presença de um corpo lúteo. A profundidade de peito influenciou a taxa de concepção ($P < 0,02$). Novilhas que possuíam espessura de gordura $> 3,4$ mm atingiram a puberdade mais cedo e fêmeas com espessura $> 2,5$ mm apresentaram maior taxa de concepção ($P = 0,0003$). O tecido adiposo é importante como fonte de leptina e por atuação nos neurônios de kisspeptina (D'Occhio *et al.*, 2019) e quando ocorre aquisição suficiente desse tecido, as novilhas atingem a puberdade mais cedo e podem atingir taxa de prenhez semelhante a novilhas mais velhas por volta dos 14 meses.

Considerações finais

Puberdade é um fenômeno bastante complexo do ponto de vista biológico, pois depende da convergência entre a idade cronológica, o desenvolvimento corporal, alimentação, genética e efeitos ambientais. Alguns desses fatores possuem impactos maiores no desenvolvimento produtivo do animal, como o potencial genético e a nutrição. Como forma de incremento à produção, a ocorrência da puberdade pode ser adiantada lançando-se mão do uso de manipulação hormonal, tanto para induzir a puberdade como para associar a indução à inseminação artificial, por meio dos protocolos de IATF à base de progesterona, estradiol e eCG.

Referências bibliográficas

- Abdoon AS, Younis AA, Kandil OM.** Trial for treatment of delayed puberty in buffalo heifers. In *IV World Buffalo Congress*, 4, 1994, São Paulo. *Anais...* São Paulo: WBC, p.354-35, 1994.
- Adams GP, Evans AC, Rawlings NC.** Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.100, p.27-33, 1994.
- Amstalden M, Garcia MR, Williams SW, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL.** Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I(1). *Biol. Reprod.*, v.63, p.127-133, 2000.
- Andurkar SB, Kadu MS.** Induction of oestrus and fertility with CIDR device and combination in non



- cycling buffaloes. *Indian J. Anim. Reprod.*, v.16, p.81–84, 1995.
- Armstrong DT.** Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.39, p.7–24, 1993.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J-P, Bortoluzzi M-N, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJM.** The stomach is a source of leptin. *Nature*, v.394, p.790–793, 1998.
- Barbosa PF.** Análise genético-quantitativa de características de crescimento e reprodutivas em fêmeas da raça Canchim. 1991. 237 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, 1991.
- Barile VL, Galasso A, Marchiori E, Pacelli C, Montemurro N, Borghese A.** Effect of PRID treatment on conception rate in mediterranean buffalo heifers. *Livest. Prod. Sci.*, v.68, p.283–287, 2001.
- Beltran MP.** Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*). 2007. 105f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, 2007.
- Block S, Butler W, Ehrhardt R, Bell A, Van Amburgh M, Boisclair Y.** Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.*, v.171, p.339–348, 2001.
- Bocchi AL, Teixeira RA, Albuquerque LG de.** Idade da vaca e mês de nascimento sobre o peso ao desmame de bezerros nelore nas diferentes regiões brasileiras. *Acta Sci. - Anim. Sci.*, v.26, p.475–482, 2008.
- Borges AM, Torres CAA, Rocha Júnior VR, Ruas JRM, Gioso MM, Fonseca JF, Carvalho GR, Maffili VV.** Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano [Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.475–482, 2004.
- Borghese A.** Buffalo Production and Research: REU technical series. Roma: FAO, v.67, p.1–315, 2005.
- Borghese A, Terzano GM, Barile VL, Annicchiarico G, Parmeggiani A.** Onset of puberty in Italian buffalo heifers. Note II – Influence of bull exposure on age at puberty. In International Symposium “Prospect of Buffalo Production in the Mediterranean and in the Middle East”, 2, 1993, Cairo. *Proceedings...* Cairo: 62, p.370–373, 1993.
- Borghese A, Terzano GM, Barile VL, Annicchiarico G, Allegrini S, Zicarelli L, Montemurro N, Pacelli C, Campanile G, Esposito L, Di Palo R, Boni R, Seren E, Parmeggiani A.** Pubertà e mantenimento dell'attività ciclica ovarica nella bufala. *Agricoltura e Ricerca*, v.153, p.5–16, 1994.
- Borghese A, Terzano GM, Barile VL, Malfatti A.** Onset of puberty in buffalo heifers in different feeding and management systems. In: International Symposium on Buffalo Resources and Production Systems, 1996, Cairo. *Anais...* Cairo: [s.n.] p.41–46, 1996.
- Borghese A, Barile VL, Ficco G, Galasso A, Marchiori E, Terzano GM.** Feeding system effect on reproduction performances in buffalo heifers. In: World Buffalo Congress, 5, 1997, Caserta. *Proceedings...* Caserta: [s.n.], p.13–16, 1997.
- Borghese A, Terzano GM, Mazzi M.** Buffalo Breeding Development In Italy (Perkembangan Program Pemuliaan Kerbau di Italia). Seminar: Dan Lokakarya Nasional, Kerbau, p.23–30, 2011.
- Bronson FH, Manning JM.** The Energetic Regulation of Ovulation: A Realistic Role for Body Fat. *Biol. Reprod.*, v.44, p.945–950, 1991.
- Burfening PJ.** Induction of puberty and subsequent reproductive performance. *Theriogenology*, v.12, n.4, p.215–221, 1979.
- Campanile G, Vecchio D, Baruselli PS, Di Palo R, Neglia G, D'Occhio MJ, Zicarelli L.** Understanding the function of the corpus luteum and the onset of puberty in buffalo. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v.4, p.1–8, 2009.
- Cardoso RC, Alves BRC, Williams GL.** Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Animal Reproduction*, v.15, p.868–878, 2018.
- Carvalho LC.** Eficiência reprodutiva de novilhas búfalas submetidas à protocolos de indução de ciclicidade. 2021. 68f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Campus Universitário de Belém, 2021.
- Ceddia RB, William WN, Lima FB, Carpinelli AR, Curi R.** Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz. J. Med. Biol.*, v.31, p.715–722, 1998.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R.** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.*, v.12, n.3, p.318–320, 1996.
- Chelikani PK, Glimm DR, Kennelly JJ.** Short Communication: Tissue Distribution of Leptin and Leptin



- Receptor mRNA in the Bovine. *J. Dairy Sci.*, v.86, n.7, p.2369–2372, 2003.
- Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JI, Weigle DS, Clifton DK, Steiner R.A.** Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in female rat. *Endocrinology*, v.138, n.2, p.855–858, 1997.
- Choudhary S, Kamboj ML, Sahu D, Dutt S, Magotra A, Singh P, Kumar N, Ungerfeld R, Kotresh Prasad C.** Effect of bioestimulation on growth rate and reproductive development of *Bos indicus* dairy heifers. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.54, n.2, p.1–8, 2022.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F.** Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.21, n.4, p.271–95, 2001.
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR.** The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, v.3, n.6, p.467–72, 1997.
- Colledge WH.** GPR54 and kisspeptins. In: *Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p.117–143.
- Darweish SA, Tawfeek K, Hussein MS, Abd EL-Razik I, Ramoun AA.** Optimizing the Age of Puberty in Buffalo Heifers by Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) and/or Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). *J. Am. Sci.*, v.12, n.9, p.20–26, 2016.
- Das A, Das D, Goswami R, Bhuyan D.** Growth performance of swamp buffaloes of Assam from birth to 12 months of age. *Buffalo Bull.*, v.23, p.84–89, 2004.
- Delavaud C, Ferlay A, Faulconnier Y, Bocquier F, Kann G, Chilliard Y.** Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.*, v.80, n.5, p.1317–1328, 2002.
- Díaz-Torga GS, Mejía ME, González-Iglesias A, Formia N, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido IM.** Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. *Theriogenology*, v.56, n.1, p.111–22, 2001.
- Di Palo R, Campanile G, Prandi A, Baruselli PS, Vecchio D, Carvalho NAT, Zicarelli L.** Plasma leptin levels in Murrah buffalo heifers fed diet with two different energy levels. *Ital. J. Anim. Sci.*, v.4, n. sup2, p.301–303, 2005.
- D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G.** Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*, v.125, p.177–284, 2019.
- D'Occhio MJ, Ghuman SS, Neglia G, Della Valle G, Baruselli PS, Zicarelli L, Visitin JA, Sarkar M, Campanile G.** Exogenous and endogenous factors in seasonality of reproduction in buffalo: A review. *Theriogenology*, v.150, p.186–192, 2020.
- Drost M.** Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology*, v.68, n.3, p.447–9, 2007.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM.** Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology*, v.45, n.1, p.121–130, 1996.
- Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, Van Amburgh ME, Bell AW and Boisclair YR (2000)** Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J. Endocrinol.*, v.166, n.3, p.519–528, 2000.
- Ehrhardt RA, Bell AW, Boisclair YR.** Spatial and developmental regulation of leptin in fetal sheep. *AM Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.282, n.6, p.R1628–R1635, 2002.
- Eler JP, Silva JA, Ferraz JB, Dias F, Oliveira HN, Evans JL, Golden BL.** Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.951–954, 2002.
- Evans ACO, Rawlings NC.** Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. *Theriogenology*, v.44, n.5, p.725–740, 1995.
- Evans ACO, Currie WD, Rawlings NC.** Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.96, n.2, p.847–855, 1992.
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC.** Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.100, n.1, p.187–194, 1994a.
- Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC.** Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.*, v.102, p.463–470, 1994b.
- Ezzat Ahmed A, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Yamashita T, Hirata TI, Sawai K, Hashizume T.** Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J. Reprod. Dev.*, v.55, p.650–654, 2009.
- Foster DL, Hileman SM.** Puberty in the Sheep. In: *Plant TM, Zeleznik AJ (Eds). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, Amsterdam: 4th ed., v.2, p.1453–1469, 2015.



- Foster DL, Karsch FJ.** Inhibition of tonic secretion of luteinizing hormone by progesterone in immature female sheep. *Endocrinology*, v.99, n.1, p.1–6, 1976..
- Freitas BG.** Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses de idade. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, 2015.
- Freitas BG, Mingoti RD, Monteiro BM, Guerreiro BM, Crepaldi GA, Ramos L, Vasconcellos GSFM, Sá-Filho MF, D'Occhio MJ, Baruselli PS.** Relationship of body maturation with response to estrus synchronization and fixed-time AI in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Livest. Sci.*, v.251, p.1-7, 2021.
- Friedman JM, Halaas JL.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v.395, n.6704, p.763–770, 1998.
- Garcia MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Nizielski SE, Williams GL.** Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.80, n.8, p.2158–2167, 2002.
- Ghuman SPS, Singh J, Honparkhe M, Dadarwal D, Dhaliwal GS, Jain AK.** Induction of ovulation of ovulatory size non-ovulatory follicles and initiation of ovarian cyclicity in summer anoestrous buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) Using melatonin implants. *Reprod. Domest. Anim.*, v.45, n.4, p.600–607, 2008.
- Gonzalez-Padilla E, Ruiz R, LeFever D, Denham A, Wiltbank JN (1975)** Puberty in Beef Heifers. III. Induction of Fertile Estrus. *J. Anim. Sci.*, v.40, n.6, p.1110–1118, 1975.
- Gordon I.** Controlled Reproduction in Cattle & Buffaloes (Controlled Reproduction in Farms Animals Series). Volume I. *Gordon, Ian* 513.
- Gressler SL, Bergmann JAG, Pereira CS, Penna VM, Pereira JCC, Gressler MGD.** Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.2, p.427–437, 2000.
- Guimarães MM.** Parâmetros Biométricos e Reprodutivos como Indicadores de Fertilidade em Novilhas Búfalas Pré-Púberes Submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo. 2020. 78f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus Universitário de Castanhal, 2020.
- Gupta SK, Singh P, Shinde KP, Lone SA, Kumar N, Kumar A.** Strategies for attaining early puberty in cattle and buffalo: A review. *Agric. Rev.*, v.37, n.2, 2016.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, v.269, n.5223, p.543–6, 1995.
- Haldar A, Prakash BS.** Growth hormone-releasing factor (GRF) induced growth hormone advances puberty in female buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.92, n.3–4, p.254–267, 2006.
- Hall JB, Staigmiller RB, Short RE, Bellows RA, Bartlett SE.** Effect of age and growth rate on induction of puberty with a progestin in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.72, p.79, 1994.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE.** Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.*, v.25, n.49, p.11349–11356, 2005.
- Hopper HW, Silcox RW, Byerley DJ, Kiser TE.** Follicular development in prepubertal heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.31, n.1–2, p.7–12, 1993.
- Houseknecht KL, Portocarrero CP.** Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.15, n.6, p.457–75, 1998.
- Ingvartsen KL, Boisclair YR.** Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.21, n.4, p.215–50, 2001.
- Izard MK, Vandenberg JG.** The effects of bull urine on puberty and calving date in crossbred beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.55, n.5, p.1160–8, 1982.
- Jaeger JR, Whittier JC, Corah LR, Meiske JC, Olson KC, Patterson DJ.** Reproductive response of yearling beef heifers to a melengestrol acetate-prostaglandin F2 α estrus synchronization system1. *J. Anim. Sci.*, v.70, n.9, p.2622–2627, 1992.
- Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd R V.** Leptin and Leptin Receptor Expression in Rat and Mouse Pituitary Cells. *Endocrinology*, v.141, n.1, p.333–339, 1999.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A.** Peripherical administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J. Endocrinol.*, v.196, n.2, p.331–334, 2008.



- Kaliannan R, Mani S, Subramaniyan P.** Effect of Ovsynch Protocol and Mineral Supplementation on Fertility in Pubertal and Peripubertal Buffalo Heifers. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, v.7, n.1, p.1940–1943, 2018.
- Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE.** Neuroendocrine Basis of Seasonal Reproduction. *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference*, p. 185–232, 1983.
- Kinder JE, Day ML, Kittok RJ.** Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.34, p.167–186, 1987.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI.** Involvement of Central Metastin in the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female Rats. *Endocrinology*, v.146, n.10, p.4431–4436, 2005.
- Knobil E.** Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3 ed. New York: Elsevier, 2006.
- Leury BJ, Baumgard LH, Block SS, Segole N, Ehrhardt RA, Rhoads RP, Bauman DE, Bell AW, Boisclair YR.** Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.285, n.5, p.R1107–R1115, 2003.
- Lima RS, Martins T, Lemes KM, Binelli M, Madureira EH.** Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. *Theriogenology*, v.154, p.128-134, 2020.
- Macedo GG, Mingoti RD, Batista EOS, Monteiro BM, Vieira LM, Barletta RV, Wiltbank MC, Nogueira GP, Rennó FP, Maio JR, Baruselli PS.** Profile of LH release in response to intramuscular treatment with kisspeptin in *Bos indicus* and *Bos taurus* prepubertal heifers. *Theriogenology*, v.125, p.64–70, 2019.
- Madgwick S, Evans ACO, Beard AP.** Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. *Theriogenology*, v.63, n.8, p.2323–33, 2005.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JA.** Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.*, v.1, n.11, p.1155–1161, 1995.
- Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P.** Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms*, v.16, n.4, p.336–347, 2001.
- Mariana JC, Monniaux D, Driancourt MA, Mauleon P.** Folliculogenesis. In: *Reproduction in Domestic Animals*. London: American Presss, 1991, p.119–171.
- Mariante AS.** Growth and reproduction in Nelore cattle in Brazil: genetic parameters and effects of environmental factors. 1978. 131f. Tese (Doutorado) - University of Florida, Gainesville, Florida, 1978.
- Martins JH, Santos CS, Silva MAV, Aguiar HMVSB, França IG, Pereira HG, Ribeiro DL, Chaves RM, Souza JAT, Monteiro BM, Sá Filho MF, Torres-Júnior JRS.** Impact of puberty status and melengestrol acetate supplementation before the breeding period on reproductive efficiency of *Bos indicus* beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.93, n.6, p.2796–2805, 2015.
- Martins Filho R, Lôbo RB.** Estimates of genetic correlations between sire scrotal circumference and offspring age at first calving in Nelore cattle. *Braz. J. Genet.*, v.14, n.1, p.208–212, 1991.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.*, v.3, n.9, p.1029–33, 1997.
- Meacham NS, Notter DR.** Heritability estimates for calving date in Simmental cattle. *J. Anim. Sci.*, v.64, p.701–705, 1987.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E.** Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. *Endocrinology*, v.140, n.12, p.5995–5998, 1999.
- Mori Y, Okamura H.** Effects of timed melatonin infusion on prolactin secretion in pineal denervated goat. *J. Pineal Res.*, v.3, n.1, p.77–86, 1986.
- Nogueira GP.** Biotecnologia da Reprodução Em Bovinos: Puberdade e Maturidade Sexual de Novilhas *Bos Indicus*. In: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 2, 2006, Londrina. *Anais...* Londrina: [s.n.], p.101-102, 2006.
- Oliveira RL, Barbosa MAAF, Ladeira MM, Silva MMP, Ziviani AC, Bagaldo AR.** Nutrição e manejo de bovinos de corte na fase de cria Beef cattle nutrition and production during reproduction phase. *Rev. Bras. Saude Prod. Anim.*, v.7, n.1, 2006.
- Oliveira CMG, Filho BDO, Gambarini ML, Liu MAO, Lopes DT, Sousa APF.** Effects of bioestimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos*



- indicus) in a tropical environment. *Anim. Reprod. Sci.*, v.113, p.38-43, 2009.
- Oliveira Filho E, Duarte FAM, Koger M.** Genetic effects on reproduction in Canchim cattle. *Braz. J. Genet*, v.4, n.1, p.281-293, 1979.
- Pacelli C, Barile VL, Lenza R, Terzano, M.G., Montemurro N, Borghese A.** Comparison of two different doses of PMSG on conception rate in Mediterranean buffalo heifers treated with PRID. In: World Buffalo Congress, 6, 2001, Maracaibo. *Anais...Maracaibo: WBC*, p.160-165, 2001.
- Parmeggiani A, Seren E, Esposito L, Borghese A, Di Palo R, Terzano G.** Plasma levels of melatonin in buffalo cows. In: International Symposium Prospects on of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East, 1993, Cairo. *Proceedings...Cairo: [s.n.]*, p.401-403, 1993.
- Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR.** Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci*, v.70, n.12, p.4018-35, 1992.
- Penchev P, Ilieva Y, Dimov K.** Effect of season of birth on season of calving and age at first calving in buffalo heifers. *Bulg. J. Agric. Sci*, v.20, n.2, p.447-451, 2014.
- Pereira MC.** Avaliação genética da reconcepção de fêmeas primíparas da raça nelore. Universidade Estadual Paulista. 73f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.
- Pereira E, Eler JP, Costa FAA, Ferraz JBS.** Análise genética da idade ao primeiro parto e do perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 53, n. 1, p. 116-121, 2001.
- Pereira E, Eler JP, Ferraz JBS (2002)** Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. *Pesqui. Agropecu. Bras*, v.37, n.5, p.703-708, 2002.
- Perry GA.** Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.373-378, 2016.
- Phogat JB, Pandey AK, Singh I.** Seasonality in Buffaloes Reproduction. *Int. J. Plant Animal Env. Sci*, v.6, n.2, p.46-55, 2016.
- Pires AV.** Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: *Bovinocultura de Corte*. Piracicaba: Fealq, p. 801-811, 2010.
- Plant TM, Ramaswamy S, DiPietro MJ.** Repetitive Activation of Hypothalamic G Protein-Coupled Receptor 54 with Intravenous Pulses of Kisspeptin in the Juvenile Monkey (*Macaca mulatta*) Elicits a Sustained Train of Gonadotropin-Releasing Hormone Discharges. *Endocrinology*, v.147, n.2, p.1007-1013, 2006.
- Polat B, Colak A, Kaya M, Ucar O.** Stimulation of delayed puberty in heifers by using a PRID regime. *Rev. Med. Vet*, v.160, p.149-153, 2009.
- Randel RD.** Unique reproductive traits of Brahman and Brahman based cows. In *Factors Affecting Calf Crop*, Ed RS Field, M. J. Sand. FL, USA: CRC Press, Boca Ratón, p.23-43, 1994.
- Rekwot P, Ogwu D, Oedipe E, Sekoni V.** Original article Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunaji and Friesian × Bunaji heifers. *Reprod. Nutr. Dev*, v.40, p.359-367, 2000.
- Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO.** The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci*, v.65, n.3-4, p.157-70, 2001.
- Ribeiro HFL.** Reprodução de Bubalinos na Região Amazônica. In: *Simpósio de Produção de Ruminantes - Aspectos nutricionais reprodutivos e sanitários*, 1, 2007, Manaus. *Anais... Manaus: Moderna Ltda*, p.74-98, 2007.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Werth LA, Cupp AS, Kojima N, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE.** Influence of Growth Rate and Exposure to Bulla on Age at Puberty in Beef Heifers. *J. Anim. Sci*, v.69, n.5, p.2092-2098, 1991.
- Rodrigues ADP, Peres RFG, Lemes AP, Martins T, Pereira MHC, Day ML, Vasconcelos JLM.** Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nellore heifers. *Theriogenology*, v.79, n.1, p.135-141, 2013.
- Rodrigues ADP, Peres RFG, Lemes AP, Martins T, Pereira MHC, Carvalho ER, Day ML, Vasconcelos JLM.** Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocol on pregnancy rate in Nellore heifers. *Theriogenology*, v.82, n.5, p.760-766, 2014.
- Roseweir AK, Millar RP.** The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod. Update*, v.15, n.2, p.203-212, 2008.
- Roy JHB, Gillies CM, Perfitt MW, Stobo IJF.** Effect of season of the year and phase of the moon on puberty and on the occurrence of oestrus and conception in dairy heifers reared on high planes of nutrition. *Anim. Prod*, v.31, n.01, p.13-26, 1980.
- Sá Filho MF, Monteiro BM, Mendanha MF, Souza AA, Giroto RW, Siqueira GR, Baruselli PS.**



- Manejo reprodutivo estratégico e IATF em novilhas e vacas primíparas zebuínas de corte. In Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 5, Londrina, 2012.
- Sá Filho MF, Nasser LFT, Penteadó L, Prestes R, Marques MO, Freitas BG, Monteiro BM, Ferreira RM, Gimenes LU, Baruselli PS.** Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.160, p.30–39, 2015.
- Saini MS, Galhotra MM, Sangwan ML, Razdan MM.** Use of PRID in inducing oestrus and its effect on the sexual behaviour of Murrah buffalo heifers. *Ind. J. Dairy Sci.*, v.41, n.1, p.40–42, 1988.
- Schillo KK, Hall JB, Hileman SM.** Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.*, v.70, n.12, p.3994–4005, 1992.
- Schoppee PD, Fouts WB, Armstrong JD.** Exogenous estradiol-17B induces precocious puberty in 8-month-old Angus heifers. *J. Anim. Sci.*, v.73, p. 222, 1995.
- Senger PL.** Pathways to Pregnancy & Parturition. 3 ed. Washington: Washington State University, Pullman, USA, 2003.
- Sheffield LG, Ellicott AR.** Effect of low levels of exogenous progesterone on puberty in beef heifers. *Theriogenology*, v.18, n.2, p.177–183, 1982.
- Short RE, Bellows RA, Carr JB, Staigmiller RB, Randel RD.** Induced or Synchronized Puberty in Heifers. *J. Anim. Sci.*, v.43, n.6, p.1254–1258, 1976.
- Silva AM, Alencar MM, Freitas AR, Barbosa RT, Barbosa PF, Oliveira MCS, Corrêa LA, Novaes AP, Tullio RR.** Herdabilidades e Correlações Genéticas para Peso e Perímetro Escrotal de Machos e Características Reprodutivas e de Crescimento de Fêmeas, na Raça Canchim. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.6, p.2223–2230, 2000.
- Silva JAI de V, Dias LT, Albuquerque LG.** Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um Rebanho Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.5, p.1568–1572, 2005.
- Silveira EF, Kozicki LE, Segui MA, Weiss RR, Santos IW, Bertol MAF.** Comparison of Long-Term Progesterone-Based Protocol on Reproductive Performance of Prepubertal and Pubertal Beef Heifers. *Arch. Vet. Sci.*, v.19, n.1, p.1–6, 2014.
- Singh J, Nanda AS, Adams GP.** The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Reprod. Sci.*, v. 60, p. 593-604, 2000.
- Smith JT.** Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res. Rev.*, v.57, n.2, p.288-298, 2008.
- Souza ALB de, Kozicki LE, Oliveira DAM de, Weiss RR, Bertol MAF, Abreu ACMR, Talini R.** Reproductive Performance of Prepubertal and Pubertal Heifers Submitted to timed Artificial Insemination Protocols. *J. Dairy Vet. Anim. Res.*, v.5, n.6, p.208–210, 2017.
- Spire MF.** Managin replacement heifers from weaning to breeding. *Vet. Med.*, v.92, p.182–192, 1997.
- St Clair EN, Patterson DJ, Schillo KK.** Progestogen treatment stimulates follicle growth without affecting LH secretion in prepubertal beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.222, 1995.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD.** A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.*, v.18, n.3, p.213–215, 1998.
- Stubbings RB, Wosik C, Armstrong DT.** Ovarian response in calves to multiple versus a single subcutaneous injection of Folltropin. *Theriogenology*, v.39, p.321, 1993.
- Tanaka Y, Vincent DL, Ledgerwood KS, Weems CW.** Variable progesterone response and estradiol secretion in prepubertal beef heifers following treatment with norgestomet implants. *Theriogenology*, v.43, n.6, p.1077–1086, 1995.
- Terzano GM, Barile VL, Francia U, Malfatti A, Todini L, Borghese A.** Onset of puberty in buffalo heifers bred on pasture or in intensive feeding system. *Bulg. J. Agric. Sci.*, v.2, p.89–92, 1996.
- Terzano GM, Neglia G, Maschio M, Barile VL, Razzano M, Martiniello P, Cannone I, Borghese A.** Effect of intensive or extensive systems on buffalo heifers performances: onset of puberty and ovarian size. *Italian J. Anim. Sci.*, v. 6, n.6, p.1273–1276, 2007.
- Thiéry JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpoux B.** Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.23, n.1-2, p.87–100, 2002.
- Toelle VD, Robison OW.** Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.60, n.1, p.89–100, 1985.
- Vale WG.** Reproductive management of water buffalo under amazon conditions. *Buffalo Journal*, v.10, n.2, p.85–90, 1994.
- Vale WG.** Enhancing the puberty in buffalo heifers. In: International Congress on Animal Reproduction,



14, 2000, Stockholm. *Anais...* Stockholm: ICAR: p.271, 2000.

Vale WG, Ribeiro HFL. Características reprodutivas dos bubalinos : puberdade , ciclo estral , involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.29, n.2, p.63–73, 2005.

Vale WG, Ohashi OM, Sousa JS, Ribeiro HFL. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. *Livestock Reproduction in Latin America*. Proceedings of the final research co-ordination meeting, Bogota, 1988. *Proceedings...* Bogota: FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, p.201–210, 1990.

Venkata Naidu G, Srinivas M, Hari Krishna NV V, Devi Prasad V. Management of Delayed Puberty in Graded Murrah Heifers Under Field Conditions - A Practical Approach. *Buffalo Bull*, v.28, n.4, p.204–206, 2009.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, v.393, n.6686, p.684–688, 1998.

Williams G, Amstalden M, Garcia M, Stanko R, Nizielski S, Morrison C, Keisler D. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol*, v.23, n.1-2, p.339–349, 2002.

Wiltbank JN, Gregory KE, Swiger LA, Ingalls JE, Rothlisberger JA, Koch RM. Effects of Heterosis on Age and Weight at Puberty in Beef Heifers. *J. Anim. Sci*, v.25, n.3, p.744–751, 1966.

Yonekura S, Senoo T, Kobayashi Y, Yonezawa T, Katoh K, Obara Y. Effects of acetate and butyrate on the expression of leptin and short-form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol*, v.133, n.2, p.165–72, 2003.

Yuen BSJ, Owens PC, McFarlane JR, Symonds ME, Edwards LJ, Kauter KG, McMillen IC. Circulating Leptin Concentrations Are Positively Related to Leptin Messenger RNA Expression in the Adipose Tissue of Fetal Sheep in the Pregnant Ewe Fed at or Below Maintenance Energy Requirements During Late Gestation. *Biol. Reprod*, v.67, n.3, p.911–916, 2002.

Zaidi NS, Anwar M. Effect of biostimulation on estrus expression, resumption of ovarian activity and conception rate in postpartum anestrous Nili-Ravi buffalos during low breeding season. *Pak. Vet. J*, v.38, n.1, p.35-38, 2018.

Zicarelli L. Management in different environmental conditions. *Proceedings...* São Paulo: WBC, p.88-112, 1994.

Zicarelli L. Reproductive seasonality in buffalo. In: Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes (Issue II), 3, 1997, Italy. *Proceedings...* Italy: [s.n.], p.29-52, 1997.

Zicarelli L, De Filippo C, Francillo M, Pacelli C, Villa E. Influence of insemination technique and ovulation time on fertility percentage in synchronized buffaloes. In: World Buffalo Congress, 5, 1997, Caserta. *Proceedings...*Caserta: [s.n.], p.732–737, 1997.
