



LAÍS REIS CARVALHO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORÁTORIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA ESCOLA
SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

LAVRAS – MG

2019

LAÍS REIS CARVALHO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORÁTORIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA ESCOLA
SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” -
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

LAÍS REIS CARVALHO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORÁTORIO DE
REPRODUÇÃO ANIMAL DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE
QUEIROZ” - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**SUPERVISED STAGE REALIZED IN ANIMAL REPRODUCTION LABORATORY
OF THE SUPERIOR SCHOOL OF AGRICULTURE "LUIZ DE QUEIROZ"
UNIVERSITY OF SÃO PAULO**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária,
para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 19 de junho de 2019.

Dr. José Nélio de Sousa Sales UFJF

Me. Ana Paula Castro Santos UFLA

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

*A Deus, e à minha família,
especialmente meus pais e meu irmão
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ser minha força e esperança ao longo desses anos me permitindo realizar o sonho de me tornar Médica Veterinária. A Nossa Senhora agradeço por estar sempre a minha frente guiando meus passos.

Aos meus pais, Augusto e Rosilane, por nunca medirem esforços para a realização desse sonho. Obrigada por todo apoio, por toda luta, compreensão e por todo amor. Essa conquista é de vocês.

Ao meu irmão, Duty, meu fiel companheiro e amigo, que sempre esteve ao meu lado me alegrando e incentivando.

Ao meu amor, Luiz Fernando, que chegou exatamente na reta final desta etapa para ser minha fonte de força e apoio. Obrigada por ser tão presente e compreensivo.

A meus avós, Joaquim e Ditinha, por serem meu exemplo de vida e superação e sempre me colocarem em suas orações diárias.

A todos meus familiares, que me ensinaram viver com honestidade, fé, simplicidade e dignidade.

À turma do Casarão, que se tornou uma família e comemorou comigo cada etapa vencida.

Às minhas amigas e afilhadas Amanda e Rafaela, por compartilharem comigo os melhores momentos durante o curso. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelo ombro amigo e pelas longas horas de estudos. Sempre lembrarei do nosso trio.

A todos os colegas de curso, pelos ensinamentos e amizade.

À Universidade Federal de Lavras por todo conhecimento transmitido por excelentes profissionais e técnicos. Em especial, ao Professor orientador de monitoria, Paulo César de Aguiar Paiva, por todo apoio, ao Professor José Nélio de Sousa Sales, pelo acolhimento, ensinamentos e oportunidades que me permitiram concluir esta etapa e ao Professor orientador José Camisão de Souza pela disponibilidade na orientação.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal – UFLA, pelo companheirismo e por toda troca de conhecimentos ao longo desses anos.

Ao Eterno grupo CEBRAUFLA e ao Professor João Bosco, por despertar meu amor pela Reprodução Animal.

À ESALQ, em especial ao LRA, pela oportunidade de realizar meu estágio supervisionado.

Ao Professor Roberto Sartori, e aos amigos do LRA, pela paciência em ensinar e por todo conhecimento transmitido.

Enfim, gratidão a todos que me ajudaram a vencer esta etapa e a realizar este sonho.

*“Não tente se tornar uma pessoa de sucesso,
mas sim uma pessoa de valor.”*

Albert Einstein

RESUMO

O estágio curricular supervisionado foi realizado no período de 04 de fevereiro a 26 de abril de 2019, no total de 440 horas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia – Setor de Ruminantes, sob supervisão do Professor Doutor Roberto Sartori Filho. Em conjunto com a Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens (linha de pesquisa em Fisiologia de Sistemas e Reprodução Animal), as atividades realizadas foram acompanhamento de experimentos, visitas de assistência veterinária no Clube de Práticas Zootécnicas (CPZ), participação em *lab meetings* semanais com discussão de temas relevantes na área de reprodução bovina e aulas de graduação e pós-graduação. As atividades desenvolvidas e acompanhadas durante o período de estágio são descritas nesse relatório. O experimento sobre a “Influência da progesterona luteal e/ou do dispositivo de P4 no perfil de liberação de LH, ovulação e desenvolvimento subsequente do CL após administração de GnRH” é descrito e discutido. Além disso, esse relatório descreve outro experimento comercial realizado e detalhamento sobre o programa reprodutivo implantado no CPZ. As experiências e conhecimentos adquiridos ao longo do estágio supervisionado foram de extrema importância para o desenvolvimento do perfil profissional, sobretudo nas áreas de reprodução animal e pesquisa científica.

Palavras-chave: hormônios, experimentos científicos, reprodução animal.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Prédio Central – ESALQ | 16 |
| Figura 2- Departamento de Zootecnia – Setor de Ruminantes..... | 17 |
| Figura 3- Almoxarifado e Laboratório pertecente ao LRA..... | 18 |
| Figura 4- Rebanho experimental do LRA e local de alimentação dos animais..... | 19 |
| Figura 5- Protocolo de Pré-Sincronização..... | 24 |
| Figura 6- Delineamento experimento “CLxP4” | 25 |
| Figura 7- Coleta de sangue por punção da veia jugular e amostras de sangue colhidas..... | 26 |
| Figura 8- Dinâmica ovariana por ultrassonografia..... | 27 |
| Figura 9- Diferentes dispositivos intravaginais utilizados..... | 29 |
| Figura 10- Delineamento experimento “6 Implantes” | 31 |
| Figura 11- Protocolo de IATF pré-estabelecido para os animais do CPZ..... | 33 |
| Figura 12- Exame neurológico em bezerro com paralisia de membros pélvicos e rompimento de vaso auricular em uma vaca do CPZ..... | 34 |
| Figura 13- Fluidoterapia em vaca no pós-parto de gestação gemelar e curativo realizado no casco de uma vaca do rebanho experimental..... | 35 |
| Figura 14- Paper apresentado no <i>lab-meeting</i> | 36 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de progesterona presente em cada dispositivo intravaginal.....30

LISTA DE SILGAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| μG | Micrograma |
| BE | Benzoato de Estradiol |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CE | Cipionato de Estradiol |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CPZ | Clube de Práticas Zootécnicas |
| CL | Corpo Lúteo |
| DEL | Dias em lactação |
| D | Dias |
| ECC | Escore de condição corporal |
| ESALQ | Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” |
| E2 | Estradiol |
| FZEA | Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos |
| G | Grama |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| IA | Inseminação Artificial |
| IATF | Inseminação Artificial em Tempo Fixo |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| LRA | Laboratório de Reprodução Animal |
| Mg | Miligrama |
| P4 | Progesterona |

| | |
|-----|---------------------------|
| PGF | Prostaglandina |
| PPG | Programa de Pós-Graduação |
| USP | Universidade de São Paulo |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO | 15 |
| 2.1 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” | 16 |
| 2.2 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens | 17 |
| 2.3 Laboratório de Reprodução Animal | 17 |
| 2.4 Clube de Práticas Zootécnicas CPZ | 20 |
| 3. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS | 20 |
| 3.1 Experimento CLxP4..... | 21 |
| 3.1.1 Referencial Teórico..... | 21 |
| 3.1.2 Objetivo | 22 |
| 3.1.3 Material e Métodos..... | 22 |
| 3.1.3.1 Animais utilizados | 22 |
| 3.1.3.2 Tratamentos | 23 |
| 3.1.3.3 Coleta de sangue | 25 |
| 3.1.3.4 Amostras de sangue e Análises Laboratoriais | 26 |
| 3.1.3.5 Dinâmica ovariana | 26 |
| 3.2 Experimento Implantes/P4 | 27 |
| 3.2.1 Referencial Teórico..... | 27 |
| 3.2.2 Objetivo | 28 |
| 3.2.3 Material e Métodos..... | 28 |
| 3.2.3.1 Animais utilizados | 28 |
| 3.2.3.2 Tratamentos | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3.3 Coleta de sangue | 30 |
| 3.2.3.4 Dinâmica Ovariana | 30 |
| 3.3 Programa Reprodutivo do CPZ | 31 |
| 3.3.1 Referencial Teórico..... | 31 |
| 3.3.2 Programa reprodutivo | 32 |
| 4. OUTRAS ATIVIDADES | 34 |
| 4.1 Clínica Médica | 34 |
| 4.2 <i>Lab-meetings</i> | 35 |
| 4.3 Disciplinas da Graduação e Pós-Graduação | 36 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 37 |
| 6. REFERÊNCIAS | 37 |

1. INTRODUÇÃO

A otimização e a maior produtividade do sistema pecuário são consequências da eficiência reprodutiva do rebanho. Nos últimos anos no Brasil, segundo os resultados preliminares do Censo Agropecuário, o efetivo alcançou a marca de 214 milhões de bovinos distribuídos aproximadamente em 149 milhões de hectares de área de pastagem, caracterizando em média, 1,15 cabeças/hectare (IBGE, 2017). Em comparação com o último censo realizado em 2006 houve pequeno aumento no número de animais por hectare, que anteriormente era de 1,10 cabeças/hectare (IBGE, 2006). Contudo, a pecuária no Brasil ainda possui produtividade muito baixa.

Em relação à eficiência reprodutiva, observou-se aumento perceptível no uso de biotecnologias da reprodução, como a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). A IATF consiste na sincronização da ovulação em fêmeas bovinas para serem inseminadas conjuntamente. Para promover a sincronização da ovulação diferentes associações hormonais são realizadas para permitir melhor sincronia e eficiência do programa reprodutivo baseado nas diferentes categorias e aptidões de um grupo de animais. A primeira estratégia para induzir a ovulação em fêmeas leiteiras e sincronizá-las em relação a sua ovulação, foi baseada na administração de GnRH em associação com prostaglandina F₂ α (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

Segundo uma pesquisa realizada pela FZEA-USP, em 2018 foram comercializados 13 milhões de protocolos de IATF, verificando aumento de 16,1% em relação ao ano anterior, indicando que 86% das inseminações no Brasil são provenientes de IATF, destacando a consolidação dessa biotecnologia (VRA/FZEA, 2019).

Nesse contexto, considerando a importância da pesquisa científica na Reprodução Animal, o estágio supervisionado foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal-USP, com ênfase na linha de pesquisa em Fisiologia de Sistemas e Reprodução Animal.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio curricular supervisionado foi realizado no período de 04 de fevereiro a 26 de abril de 2019, totalizando carga horária de 440 horas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia – Setor de Ruminantes, sob supervisão do professor Roberto Sartori Filho.

2.1 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Em 1901, Luiz Vicente de Souza Queiroz doou terras ao governo do estado de São Paulo para a fundação de uma Escola Agrícola, nomeada como “Escola Agrícola Prática São João de São Paulo. Posteriormente (1934), a escola passou a se chamar “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” em homenagem ao seu idealizador (Figura 1).

Figura 1: Prédio Central - ESALQ



Fonte: Do autor (2019)

A ESALQ, como é reconhecida atualmente, está sediada na cidade de Piracicaba - São Paulo, sendo uma unidade da Universidade de São Paulo de grande importância para o desenvolvimento industrial e agrícola. Com área de 3.825 hectares, formada pelo Campus Luiz de Queiroz (914 hectares) e pelas estações experimentais de Anhembi, Anhumas, Itatinga e Fazenda Areão (2911 hectares), representa aproximadamente 49% da área total da USP. Possui 7 cursos de graduação nas áreas de ciências agrárias, ambientais, biológicas e sociais aplicadas, distribuídos em 12 departamentos, incluindo o Departamento de Zootecnia (Figura 2).

Figura 2: Departamento de Zootecnia – Setor de Ruminantes



Fonte: Do autor (2019)

A escola foi a pioneira no âmbito da USP em implantar programas de Pós-Graduação, sendo reconhecida em 1969 pela CNPq como “centro de excelência” para o desenvolvimento de Pós-Graduação e pesquisa em Ciências Agrárias. Em 1970, a escola se caracterizou como a primeira na América Latina a oferecer cursos de Doutorado, nas áreas de Fitopatologia, Genética e Melhoramento de Plantas e Solos e Nutrição de Plantas. Atualmente, o programa de Pós-Graduação conta com cursos em 18 áreas.

2.2 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens

Em 1966, o curso de mestrado em Nutrição Animal e Pastagens foi incorporado ao Programa de Pós-Graduação, que posteriormente viria a se chamar Ciência Animal e Pastagens. Após 32 anos de criação, em 1998 incluiu-se o doutorado ao programa. O PPG é composto atualmente por quatro linhas de pesquisas: Fisiologia de Sistemas e Reprodução Animal, Melhoramento Genético Animal, Genética Molecular e Bioestatística, Produção de Monogástricos e Aquicultura e Produção de Ruminantes, Pastagens e Forragicultura. Na avaliação quadrienal realizada pela CAPES, os cursos de Mestrado e Doutorado possuem conceito máximo (7), caracterizando-se como programa de excelência internacional.

2.3 Laboratório de Reprodução Animal

O Laboratório de Reprodução Animal (LRA) – ESALQ/USP pertencente ao departamento de Zootecnia, conta com infraestrutura dividida em um almoxarifado para armazenamento de materiais e fármacos usados nos experimentos, um laboratório com equipamentos para análise de sêmen, processamento de sangue, equipamentos de estocagem

como refrigeradores e estufas e salas para estudos (Figura 3). Além disso, o LRA possui rebanho experimental de 37 vacas da raça Holandesa não-lactantes.

Figura 3: Almoxarifado e Laboratório pertencente ao LRA



Fonte: Do autor (2019)

Os animais do rebanho experimental são mantidos dentro do campus universitário em piquetes com água e sal mineral *ad libitum*, e são alimentadas uma vez por dia com feno de Tifton e concentrado à base de milho (3 kg/animal/dia) em barracão coberto onde os animais possuem livre acesso ao longo do dia (Figura 4).

Figura 4: Rebanho experimental do LRA e local de alimentação dos animais





Fonte: Do autor (2019)

2.4 Clube de Práticas Zootécnicas - CPZ

Criado em 1977, o clube de práticas zootécnicas é um grupo de extensão pertencente ao Departamento de Zootecnia, que desenvolve atividades nas áreas de bovinocultura de corte e leite, manejo e produção de pastagens, nutrição de ruminantes e forragens suplementares (Cana, Milho, Sorgo, etc.). O clube gerencia dentro da universidade um rebanho de vacas da Raça Holandesa lactantes que são ordenhadas diariamente duas vezes ao dia. O manejo reprodutivo dos animais é auxiliado pelo LRA, que implementou um programa reprodutivo de IATF.

3. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Experimentos científicos são desenvolvidos rotineiramente no LRA. Durante o período de estágio foi possível acompanhar dois experimentos que estavam sendo realizados. Houve auxílio e acompanhamento nos manejos experimentais com os animais e

procedimentos laboratoriais e em visitas semanais do programa reprodutivo implantando no CPZ.

3.1 Experimento CLxP4

Durante o período de estágio supervisionado foi possível acompanhar e auxiliar nas atividades do experimento intitulado “Influência da progesterona luteal e/ou do dispositivo de P4 no perfil de liberação de LH, ovulação e desenvolvimento subsequente do CL após administração de GnRH”, que teve início de suas atividades a campo em outubro de 2018 e ainda está em andamento.

3.1.1 Referencial Teórico

O GnRH foi caracterizado pela primeira vez em 1971 (MATSUO; BABA; ARIMURA, 1971), sendo o principal responsável pelo controle do eixo reprodutivo nos mamíferos (CLARKE; POMPOLO, 2005). De origem hipotalâmica e secretado diretamente na circulação porta-hipofisária, esse neuropeptídeo formado por uma cadeia de 10 aminoácidos possui meia vida de 2 a 4 minutos (HANDELSMAN; SWERDLOFF, 1986).

O GnRH induz diretamente a liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior, principalmente na liberação de LH (CLARKE; CUMMINS 1982). A síntese e secreção desse neuropeptídeo é sensível ao *feedback* produzido pelos hormônios esteroidais gonadais, porém seus neurônios secretores não apresentam receptores de P4 ou E2, sendo necessário o reconhecimento dos esteroides por neurônios adjacentes (neurônios KNDy) presentes no núcleo arqueado, que modulam a pulsatilidade do GnRH (CLARKE; POMPOLO, 2005).

Após a caracterização e identificação química do GnRH, e entendimento sobre sua síntese e secreção, várias substâncias análogas foram desenvolvidas e utilizadas para melhorar a eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas (THATCHER et al., 1993). Sua utilização se baseia no princípio de promover o pico de LH, após administração exógena, e consequentemente, induzir a ovulação de um folículo ovulatório (SILCOX; POWELL; KISER., 1993; SOUZA et al., 2009). Dessa maneira, para maior eficiência da utilização do GnRH no início de um protocolo de IATF é necessário que as vacas possuam um folículo dominante pré ovulatório.

A liberação de LH e a resposta ovulatória após a administração de GnRH é dependente de vários fatores. Segundo Vasconcelos et al. (1999), a resposta a administração de GnRH depende do momento do ciclo estral que as vacas se encontram, sendo observado maior resposta entre o quinto e nono dia do ciclo estral (96% de ovulação). Em contraste, quando a

administração do GnRH no início de protocolo é realizada em momento aleatório do ciclo estral a taxa de ovulação é menor (50%; BILBY et al., 2013; BISINOTTO et al., 2013; LOPES et al., 2013). Nesse contexto, estratégias de pré-sincronização para aumentar a ovulação ao primeiro GnRH foram desenvolvidas para estabelecer o melhor momento do ciclo estral em que o folículo tenha resposta ovulatória (PETERS; PURSLEY, 2002; SOUZA et al., 2008). Ayres et al. (2013) demonstraram que 80% das vacas ovulam ao primeiro GnRH quando submetidas ao protocolo de Duplo *Ovsynch*. Um protocolo de pré-sincronização descrito por Silva et al. (2018) obteve resultados semelhantes ao Duplo *Ovsynch*, o qual consistia na indução de um maior folículo usando um dispositivo de progesterona.

Outro fator que está diretamente relacionado ao pico de LH e a resposta ovulatória é a utilização de diferentes doses e análogos de GnRH. Doses maiores de GnRH foram capazes de elevar a concentração e o pico de LH em *Bos taurus* de corte (COLAZO et al., 2009) e de leite (SOUZA et al., 2009). Segundo, Picard-Hagen et al. (2015), a gonadorelina induziu pico de LH menor em comparação a lecirelina, fertirelina e buserelina. Esses achados indicam que diferentes análogos de GnRH podem resultar em picos diferentes de LH, mesmo em ambientes com alta P4.

A concentração circulante de progesterona no momento da administração de GnRH também é considerada fator que afeta o pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação. Alguns autores verificaram que a concentração e o pico de LH foram menores em ambientes de alta concentração de progesterona no momento da administração de GnRH (Giordano et al. (2012). Além disso, menor taxa de ovulação foi observada em novilhas de corte (*Bos taurus*; Colazo et al., 2008; Dias et al., 2010) e em novilhas da raça Angus (Dias et al., 2010) animais tratados com gonadorelina em ambientes de alta P4 circulante.

3.1.2 Objetivo

O objetivo do experimento acompanhado durante o período de estágio foi avaliar a influência da P4 circulante secretada pelo CL e/ou liberada por um dispositivo de P4 no perfil de liberação de LH, ovulação e desenvolvimento subsequente do CL após a administração de uma dose convencional de GnRH.

3.1.3 Material e Métodos

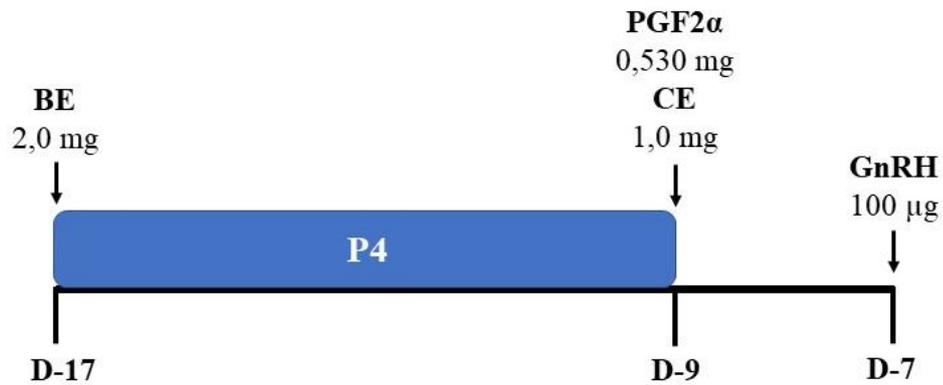
3.1.3.1 Animais utilizados

O experimento foi dividido em quatro réplicas, totalizando 80 animais. Foram utilizadas vacas da raça Holandesa não lactantes pertencentes ao rebanho experimental do LRA-ESALQ, que permaneceram sob o mesmo manejo nutricional citado anteriormente.

3.1.3.2 Tratamentos

Todos os animais utilizados foram previamente submetidos a um protocolo de pré-sincronização, iniciando no D-17 com a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado por 8 dias em associação com a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE). No D-9 foi administrado 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE) juntamente com a retirada do dispositivo de P4. Dois dias após a retirada, no D-7, foi administrado 100 µg de gonadorrelina (GnRH) com intuito de induzir a ovulação (Figura 5). Após o fim do protocolo de pré-sincronização, no D-5, foi realizada dinâmica ovariana por ultrassonografia para confirmar a ovulação. Posteriormente (D-1,5), no período da tarde, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, de acordo com o tratamento, em um arranjo fatorial 2x2. Os tratamentos foram definidos de acordo com a presença ou não de CL no D0 e inserção ou não de um dispositivo intravaginal de progesterona no momento da administração de GnRH. Os grupos foram definidos como: **CLP4**, com presença de CL e inserção de P4; **CLP40**, com presença de CL sem a inserção de P4; **CL0P4**, ausência de CL com inserção de P4 e **CL0P40**, ausência de CL sem inserção de P4.

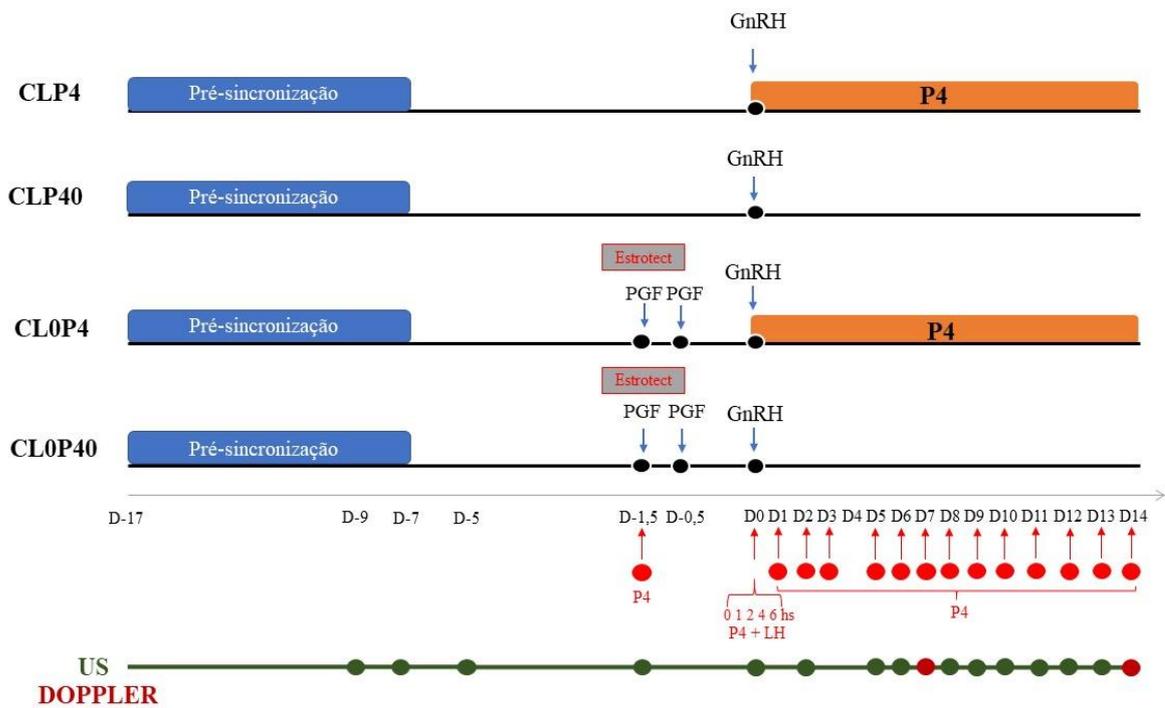
Figura 5: Protocolo de Pré-Sincronização



Fonte: Do autor (2019)

Nos grupos com ausência de CL (CL0P4 e CL0P40) foi administrado no dia D-1,5 uma dose de 0,530 mg PGF, realizada a coleta de sangue para dosagem de P4, dinâmica ovariana e inserção de um adesivo de detecção de cio (EstroTECT), para assegurar que a ovulação fosse proveniente da administração do GnRH. Para garantir a luteólise foi administrada uma segunda dose de 0,530 mg de PGF no D-0,5. A administração de 100 µg de gonadorelina foi feita no D0 para todos os grupos juntamente com a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona de 2g nos grupos CLP4 e CL0P4 que permaneceu por 14 dias (Figura 6).

Figura 6: Delineamento experimento “CLxP4”



Fonte: Do autor (2019)

3.1.3.3 Coleta de Sangue

No D0, concomitantemente a administração de gonadorrelina foi realizada coleta de sangue por punção da veia jugular para análise do perfil de P4 e LH, assim como nas horas 1, 2, 4 e 6 após o GnRH. Para avaliação da concentração de P4 circulante foram colhidas amostras no D1, D2, D3, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13 e D14 do protocolo (Figura 7).

Figura 7: Coleta de sangue por punção da veia jugular e amostras de sangue colhidas



Fonte: Do autor (2019)

3.1.3.4 Amostras de sangue e análises laboratoriais

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular, em tubos heparinizados do tipo *Vacutainer* de 9ml e colocadas imediatamente em ambiente refrigerado para o transporte até a centrifuga. O sangue foi processado a 1700 x g por 15 minutos para obtenção do plasma e armazenado a -20°C para posterior análise.

3.1.3.5 Dinâmica ovariana

A dinâmica ovariana e avaliação do volume folicular e luteal foi realizada em todos os animais nos dias 0, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 por ultrassonografia transretal em modo B (Figura 8). No D7 e D14 foi realizada ultrassonografia em modo Doppler para avaliar vascularização e diâmetro do CL.

Figura 8: Dinâmica ovariana por ultrassonografia



Fonte: Do autor (2019)

3.2 Experimento implantes/P4

Um experimento de caráter comercial, ainda sem título definido, foi desenvolvido pelo LRA e foi possível acompanhar, durante o período de estágio, o início das atividades experimentais a campo e no laboratório.

3.2.1 Referencial Teórico

A progesterona é um progestágeno natural secretado pelas células luteínicas do corpo lúteo, placenta e pelas glândulas adrenais. É considerada um esteroide, sendo transportada pela corrente circulatória por proteína de ligação e sua secreção é estimulada primeiramente por ação do LH (HAFEZ, 2004). A P4 é responsável por modular várias funções reprodutivas,

como crescimento folicular e nutrição inicial do embrião (MANN; LAMMING, 2001). Além disso, promove o bloqueio da expressão de estro e da ovulação (COLAZO et al., 2007).

A produção de progesterona em ruminantes é realizada a partir de duas enzimas, a P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1), que é responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona e a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3 β), que converte a pregnenolona em progesterona, além da participação de uma proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR) que realiza o transporte do colesterol para dentro da membrana mitocondrial (NASCIMENTO et al., 2013). A metabolização da progesterona ocorre no fígado e está diretamente relacionada com a nutrição e metabolismo do animal. Quando comparadas vacas lactantes e não-lactantes em dietas de baixa e alta ingestão alimentar, em relação ao metabolismo de hormônios esteroides, Sangsritavong et al. (2002) observaram que os animais em alta dieta apresentavam maior fluxo sanguíneo hepático e, conseqüentemente, maior metabolização dos hormônios esteroides. Dessa maneira, baixas concentrações séricas de esteroides podem comprometer algumas funções fisiológicas e afetar diretamente a reprodução de vacas, principalmente em lactação (SARTORI et al., 2004).

Nesse contexto, os progestágenos são amplamente utilizados na reprodução. Sua utilização ocorreu primeiramente na década de 50 com surgimento de protocolos de sincronização de estro (CHRISTIAN; CASIDA, 1948). Inicialmente, o material de veículo do progestágeno era formado por implante subcutâneo de norgestomet (WILTBANK; GONZALES-PADILLA, 1975). Posteriormente, esse material foi aprimorado passando a ser de silicone, o que resultava em liberação constante e padronizada do esteroide (KESLER; FAVERO; TROXEL, 1995). Atualmente, a forma mais utilizada em protocolos de IATF são os dispositivos intravaginais de liberação de progesterona que contem diferentes concentrações e resulta em imediato aumento da concentração circulante de progesterona (PUGLIESI et al., 2014).

3.2.2 Objetivo

Desta maneira, um experimento de caráter comercial foi realizado pelo LRA, com objetivo de dosar a progesterona circulante após a inserção de diferentes dispositivos intravaginais de progesterona com concentrações diferentes.

3.2.3 Material e Métodos

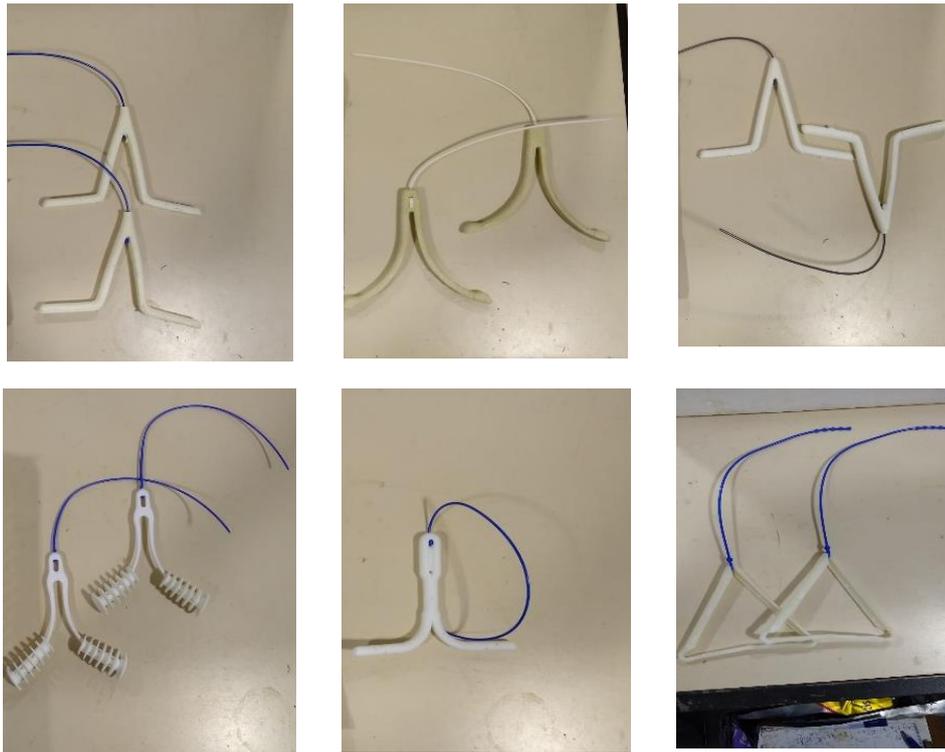
3.2.3.1 Animais utilizados

No estudo foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, não lactantes do rebanho experimental do LRA. O manejo nutricional foi o mesmo utilizado no estudo anterior.

3.2.3.2 Tratamentos

Todos os animais foram pré-sincronizados com a inserção de um dispositivo intravaginal de P4 utilizado previamente por 8 dias no D-9. No D-3 e D-2 foi administrado 0,530mg de PGF e retirada do dispositivo de P4 no D-2. Imediatamente após esses procedimentos foi inserido um implante auricular de norgestomet (CRESTAR®) utilizado previamente por 2 dias. O objetivo de utilizar o implante auricular de norgestomet foi não alterar a progesterona circulante e evitar a ovulação. Dois dias depois o implante auricular de norgestomet, foi removido e os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona em associação com a administração de 2 mg de BE (D0). Foram utilizados 6 diferentes tipos de implantes de P4 (Figura 9) com concentrações variadas, porém todos novos (tabela 1).

Figura 9: Diferentes dispositivos intravaginais utilizados



Fonte: Do autor (2019)

Tabela 1: Quantidade de progesterona presente em cada dispositivo intravaginal.

| Nome Comercial | Quantidade de progesterona |
|-----------------|----------------------------|
| PRID® | 1,55 g |
| DIB0.5 | 0,5 g |
| DIB1.0 | 1,0 g |
| FERTILCARE 1200 | 1,2 g |
| CUE-MATE® | 1,56 g |
| SINCROGEST® | 1,0 g |

Os animais foram bloqueados para receber o implante de acordo com escore corporal para não haver interferência desse fator na concentração circulante de progesterona. Dessa maneira, grupos de 4 animais foram formados para receber os diferentes tipos de dispositivo intravaginal, que permaneceram por 14 dias.

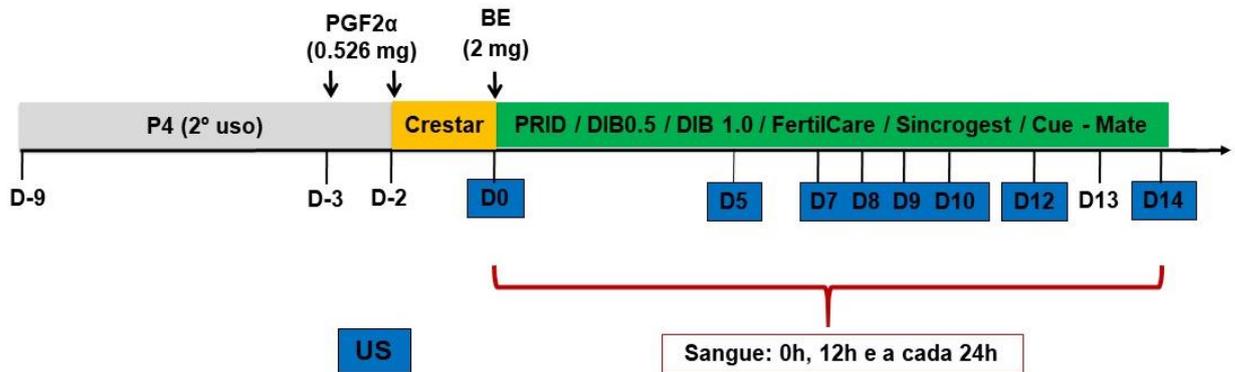
3.2.3.3 Coleta de sangue

Amostras de sangue foram colhidas na hora 0, 12 e 24 após a inserção do dispositivo intravaginal até a sua retirada (D14) para avaliar a concentração de progesterona. A metodologia de coleta e processamento de sangue foram semelhantes aos realizados no experimento anterior

3.2.3.4 Dinâmica ovariana

A dinâmica folicular foi realizada por ultrassonografia nos dias 0, 5, 7, 8, 9, 10, 12 e 14 para acompanhar volume folicular e permanência do folículo em crescimento, sem ovulação, durante o tratamento (figura 10). Três réplicas desse delineamento foram realizadas para que todas as vacas recebessem diferentes tipos de dispositivo intravaginal de progesterona do estudo. Os resultados não foram concluídos e disponibilizados. As amostras de plasma sanguíneo ainda não foram analisadas.

Figura 10: Delineamento experimento “6 Implantes”



Fonte: Do autor (2019)

3.3 Programa reprodutivo do CPZ

O LRA implantou um programa reprodutivo no CPZ com visitas semanais em que são realizados exames ultrassonográficos para avaliação reprodutiva e diagnósticos de gestação e início do protocolo de IATF nas vacas aptas a serem inseminadas.

3.3.1 Referencial Teórico

Em sistemas de produção leiteira, a eficiência reprodutiva é determinante para o sucesso econômico da atividade. A baixa taxa de serviço, devido falhas na detecção de cio e a baixa taxa de concepção por problemas ambientais, manejos e sanitários são os principais fatores que acarreta em baixa eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros. Alternativas como a IATF são utilizadas a fim de sincronizar a ovulação, sem a necessidade da observação de cio, aumentando o número de animais inseminados (taxa de serviço).

Os protocolos de sincronização da ovulação em bovinos de leite devem atender algumas premissas para obter resultados satisfatórios. Primeiramente, se faz necessário a sincronização da emergência de uma nova folicular, por indução da ovulação ou atresia folicular. Em sequência, controlar as concentrações de progesterona circulante, através de agentes luteolíticos e administração exógena de P4 e por fim, induzir a ovulação de um folículo maduro ao final do protocolo (SARTORI, 2007)

Nesse contexto, os programas hormonais de sincronização foram aprimorados ao longo dos anos para aumentar a sincronização da ovulação. Pursley, Mee, Wiltbank (1995) desenvolveram um protocolo de sincronização da ovulação pela combinação de PGF2α e

GnRH, conhecido com *Ovsynch*. Atualmente, existem outras opções de protocolos de IATF que consiste na associação de progesterona com estradiol (BÓ et al., 1995). Apesar das duas alternativas de protocolos hormonais, as taxas de concepção do rebanho leiteiro ainda se mantem baixas, sendo necessária a associação e combinação de diferentes hormônios para melhorar a eficiência de programas reprodutivos.

Em um estudo recente foi avaliada a taxa de concepção de um rebanho leiteiro utilizando GnRH em substituição ao benzoato de estradiol (BE) no protocolo com associação de progesterona. O uso de GnRH concomitante a inserção do dispositivo de P4 resultou em 38,2% de prenhez aos 32 dias e 32,9% aos 60 dias, e o uso de BE no início do protocolo obteve 33,7% e 28,9% de prenhez aos 32 e 60 dias, respectivamente. Esses resultados evidenciaram a tendência de uma maior eficiência do protocolo quando utilizado a associação de GnRH com o dispositivo de progesterona, demonstrando maior sincronização pela remoção de parte dos folículos persistentes que não sofrem atresia no D0 e pelo crescimento do folículo ovulatório em ambiente com alta progesterona (MELO et al., 2016). Em outro estudo, verificaram que a associação de GnRH e BE no início do protocolo de IATF e a administração de duas doses de PGF ao final, aumentou a taxa de prenhez em protocolos de IATF a base de progesterona e estrógeno em relação ao protocolo convencional com BE no D0 (Controle) e uma dose de prostaglandina (PGF) na retirada do dispositivo de P4 e ao protocolo com BE no D0 associado com duas administrações de PGF ao final do protocolo (Grupo Controle 30%, Grupo 2PGF 33,2% e Grupo GnRH+2PGF 37,3% de prenhez; PEREIRA et al.; 2015).

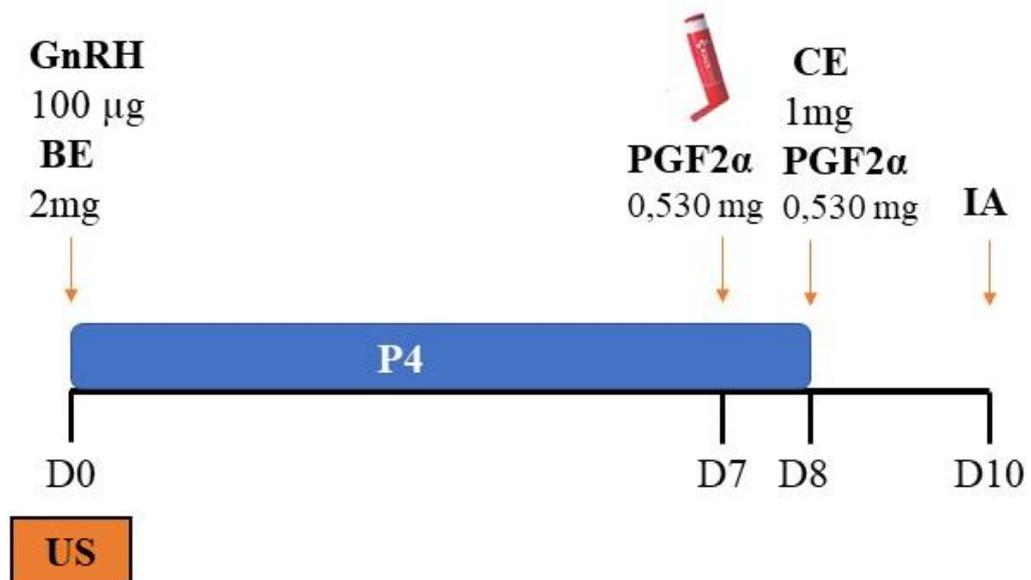
O programa reprodutivo utilizado no CPZ utiliza a associação de GnRH e BE e um dispositivo de progesterona no início do protocolo, administração de duas doses de PGF e utilização de CE como indutor da ovulação.

3.3.2 Programa reprodutivo

O Programa reprodutivo implantado no CPZ consiste em visitas semanais realizadas pelos Pós-Graduandos juntamente com os estagiários. Na visita é realizado exame ultrassonográfico das vacas aptas a serem inseminadas e diagnóstico de gestação dos animais anteriormente protocolados. O período de espera voluntário pré-estabelecido na CPZ é de 35 dias. Após esse período, os animais são avaliados e inicia-se o protocolo de IATF. Como a avaliação ocorre semanalmente, são avaliadas vacas de 32 a 39 dias em lactação (DEL).

O protocolo estabelecido para as vacas aptas a serem inseminadas consiste na administração de 2mg BE (Sincrodiol) e 10 µg de acetato de buserelina (Sincroforte) acompanhado da inserção de um dispositivo de liberação de progesterona (2g Reprosync ou 1g Sincrogest) no dia 0. O uso do implante de P4 é dependente da produção de leite de cada animal. Vacas em lactação recebem o implante novo, enquanto que vacas secas e novilhas recebem implantes reutilizados 1 ou 2 vezes. No dia 7, administra-se 0,530 mg Cloprostenol sódico (Sincrocio) e realiza-se a marcação do animal com bastão de tinta referente ao dia do manejo (neste caso D7) para facilitar o manejo no próximo dia do protocolo. No D8 é realizada a retirada do implante de P4, administração de mais uma dose de 0,530 mg Cloprostenol sódico (Sincrocio) para garantir a luteólise e 1mg cipionato de estradiol (Sincroecp) como indutor da ovulação. A inseminação é realizada 48 horas após a retirada da P4 (Figura 11). Ambos os manejos de D8 e de IA são realizados pelos integrantes do CPZ.

Figura 11: Protocolo de IATF pré-estabelecido para os animais do CPZ



Fonte: Do autor (2019)

Após o protocolo de IATF, os animais são avaliados por ultrassonografia 33 a 40 dias para diagnóstico de gestação. No mesmo dia, é realizada a confirmação para 60, 90, 120, 150 e 210 dias, caso ocorra perda embrionária ou o aborto, os animais são avaliados e protocolados novamente.

4. OUTRAS ATIVIDADES

4.1 Clínica Médica

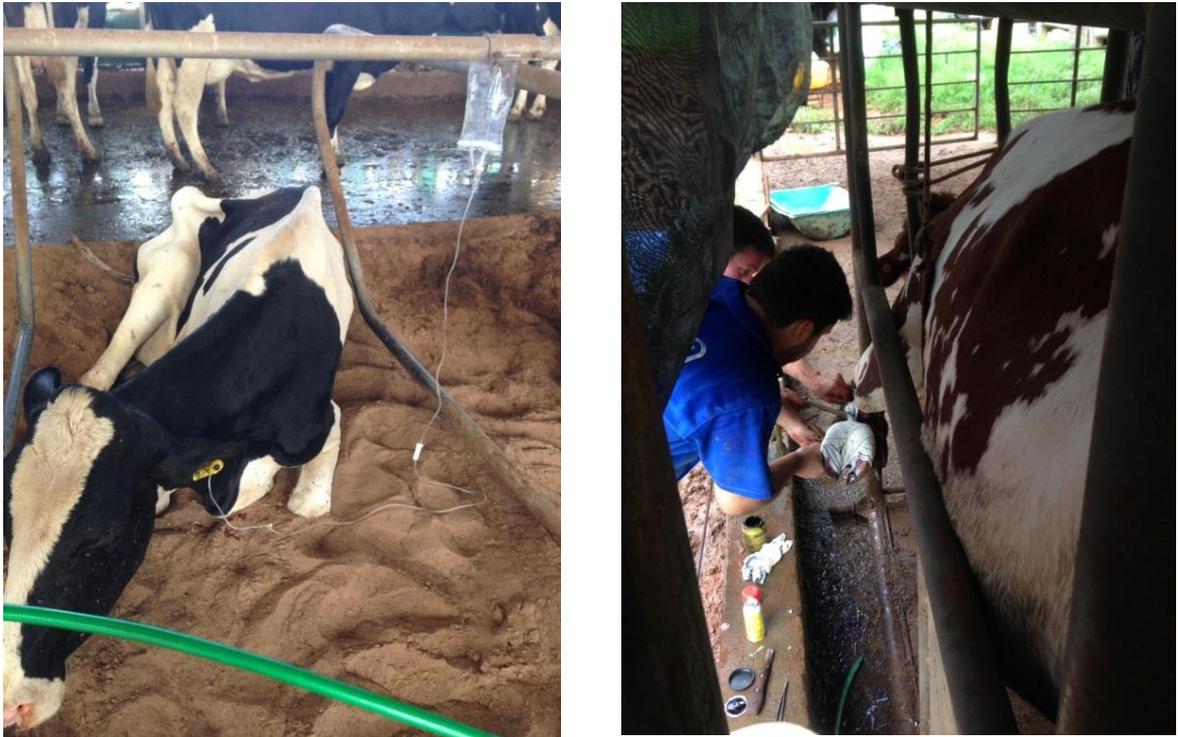
Durante as visitas realizadas ao CPZ, foram acompanhados alguns exames clínicos, procedimentos de limpeza e curativo em uma vaca com rompimento de vaso auricular e terapia de suporte aos animais debilitados. No rebanho experimental do LRA, foram acompanhados manejos de cascos dos animais, bem como procedimento curativos e administração de medicamentos quando necessário (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Exame neurológico em bezerro com paralisia de membros pélvicos e rompimento de vaso auricular em uma vaca do CPZ.



Fonte: Do autor (2019)

Figura 13: Fluidoterapia em vaca no pós-parto de gestação gemelar e curativo realizado no casco de uma vaca do rebanho experimental



Fonte: Do autor (2019)

4.2 *Lab-meetings*

Semanalmente foram realizadas reuniões, intituladas como *lab-meetings*, no qual artigos científicos foram apresentados e discutidos. As apresentações ficaram a cargo dos estagiários, e os temas escolhidos pelos pós-graduandos eram ligados aos seus projetos de pesquisas. No total, foram apresentados seis artigos relacionados à influência da progesterona na liberação de LH após administração de GnRH e mecanismos para formação de folículo persistente e sua influência na qualidade do oócito (Figura 14).

Figura 14: Paper apresentado no *lab-meeting*



Fonte: Do autor (2019)

4.3 Disciplinas da Graduação e Pós-graduação

Durante o período de estágio houve participação em aulas ministradas pelo Supervisor Prof. Roberto Sartori. A disciplina “Manejo da Reprodução e da Inseminação Artificial” ministrada para a turma da Graduação tem como objetivo transmitir conhecimentos teóricos sobre fisiologia da reprodução das diferentes espécies e conhecimentos práticos, especialmente relacionados a técnica de Inseminação Artificial. Foram acompanhadas 6 aulas teóricas referentes a Anatomia e fisiologia do macho e da fêmea, manejo reprodutivo de vacas e novilhas de corte e leite e 1 aula prática de coleta e análise de sêmen em cordeiros.

A disciplina “Nutrição e Eficiência Reprodutiva em Ruminantes” é ministrada para pós-graduandos do PPG “Ciência Animal e Pastagens” e aborda temas aprofundados sobre a influência da nutrição na reprodução de Ruminantes, além de aprimorar técnicas de comunicação científica. Foram acompanhadas 5 aulas teóricas sobre Fisiologia da Reprodução, Noções Gerais de Nutrição, Estatística aplicada, Nutrição e Reprodução em gado de corte e Nutrição de Reprodução em vacas de alta produção leiteira.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficiência reprodutiva é fundamental para maior produtividade em sistemas de produção de bovinos. Nesse contexto, o mercado de trabalho atual demanda por profissionais com capacitação técnica, especializados e cada vez mais atualizados.

A escolha do LRA para a realização do estágio proporcionou o treinamento das técnicas relacionadas a reprodução, como a realização de dinâmica ovariana por ultrassonografia e diagnósticos de gestação bem como a aquisição de maiores conhecimentos sobre reprodução bovina, por meio das aulas de graduação de pós-graduação, dos *lab-meetings* e das discussões para embasamento dos experimentos que estavam sendo realizados.

Durante o período de estágio, ficou evidente a importância da pesquisa para aprimoramento dos protocolos de IATF para alcançar melhores resultados de fertilidade, principalmente em rebanhos leiteiros. Dessa maneira, a vivência com os pós-graduandos dentro do PPG Ciência Animal e Pastagens e com o supervisor Prof. Roberto Sartori foi de extrema importância para desenvolvimento do senso crítico sobre as ferramentas disponíveis e utilizadas na reprodução bovina e na experiência da rotina de trabalho e estudos dentro da pesquisa científica.

6. REFERÊNCIAS

- AYRES, H. et al. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 159-164, 2013.
- BASTOS, Michele Ricieri. Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. 2012.
- BILBY, T. R. et al. Supplemental progesterone and timing of resynchronization on pregnancy outcomes in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 11, p. 7032-7042, 2013.
- BINELLI, Mario et al. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. **Juengel, JL; Miyamoto, A; Price, C; Reynolds, LP**, p. 493-506, 2014.
- BISINOTTO, R. S. et al. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 4, p. 2214-2225, 2013.
- BO, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995.

CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. The effects of progesterone in altering the estrus cycle of the cow. In: **Journal of Animal science**. 1111 NORTH DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874: AMER SOC ANIMAL SCIENCE, 1948. p. 540-540.

CLARKE, Iain J.; CUMMINS, James T. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v. 111, n. 5, p. 1737-1739, 1982.

CLARKE, Iain J.; POMPOLO, Sueli. Synthesis and secretion of GnRH. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1-2, p. 29-55, 2005.

COLAZO, Marcos G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic animal endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2008.

COLAZO, Marcos G. et al. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 1, p. 49, 2007.

COLAZO, M. G. et al. Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 984-992, 2009.

CULTURA E EXTENSÃO-ESALQ/USP. **Clube de Práticas Zootécnicas-CPZ**. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/svcex/node/6299>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Histórico**. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/institucional/historico>. Acesso em: 28 de abril de 2019.

DIAS, F. C. F. et al. Progesterone concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. **Domestic animal endocrinology**, v. 39, n. 3, p. 155-162, 2010.

GANDRA, Jefferson Rodrigues et al. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean Buffaloes (*Bubalis bubalis*) fed with corn-silage based diets. **Livestock science**, v. 140, n. 1-3, p. 283-291, 2011.

GIORDANO, J. O. et al. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 3781-3793, 2012.

HAFEZ, Elsayed Saad Eldin; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 2004.

HANDELSMAN, David J.; SWERDLOFF, Ronald S. Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone and its analogs. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 1, p. 95-105, 1986.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017: Resultados preliminares**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?=&t=downloads>. Acesso em: 07 de maio de 2019.

KESLER, D. J.; FAVERO, R. J.; TROXEL, T. R. A comparison of hydron and silicone implants in the bovine norgestomet and estradiol valerate estrus synchronization procedure. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 21, n. 4, p. 475-485, 1995.

LOPES JR, G. et al. Effect of timing of initiation of resynchronization and presynchronization with gonadotropin-releasing hormone on fertility of resynchronized inseminations in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 6, p. 3788-3798, 2013.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.

MATSUO, H., Y. BABA, A. ARIMURA, V.A. **Hospital, and N. Orleans**. 1971. Received May 6, 1971 43:1334–1339.

MELO, L. F. et al. Circulating progesterone concentrations in nonlactating Holstein cows during reuse of intravaginal progesterone implants sanitized by autoclave or chemical disinfection. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 3537-3544, 2018.

MELO, L. F. et al. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: Gonadotropin-releasing hormone versus estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate versus estradiol benzoate at the end. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 11, p. 9227-9237, 2016.

NASCIMENTO, A. B. et al. Produção e metabolismo da progesterona e seu papel antes, durante e depois da inseminação artificial influenciando a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1130, 2013.

PEREIRA, M. H. C. et al. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 2, p. 947-959, 2015.

PEREIRA, M. H. C. et al. Timing of prostaglandin F2 α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 5, p. 2837-2846, 2013.

PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R. Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF2 α and GnRH. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 9, p. 2403-2406, 2002.

PICARD-HAGEN, N. et al. Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177-183, 2015.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO- ESALQ/USP. **Histórico da Pós-Graduação na ESALQ**. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/pg/sobre/historia-da-pos>. Acesso em: 28 de abril de 2019.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO- ESALQ/USP. **Ciência Animal e Pastagens**. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/pg/programas/ciencia-animal-e-pastagens/>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

PUGLIESI, G. et al. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 1, p. 85-91, 2014.

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

SALES, J. N. S. et al. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1093-1100, 2015.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, Roberto. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. In: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007., 2007.

SILCOX, R. W.; POWELL, K. L.; KISER, T. E. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **J. Anim. Sci**, v. 71, n. Suppl 1, p. 219, 1993.

SILVA, L. A. C. L. et al. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. **Theriogenology**, v. 119, p. 233-237, 2018.

SOUZA, A. H. et al. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

SOUZA, A. H. et al. Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 271-279, 2009.

SOUZA, A. H. et al. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 722-733, 2011.

TEIXEIRA, Alessandra Ambrósio. **Impacto da inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

THATCHER, W. W. et al. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 27-49, 1993.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

VRA: Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. **Boletim Eletrônico: Avaliação do mercado de IATF no Brasil**. Publicado em 19 de fevereiro de 2019. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 07 de maio de 2019.

WILTBANK, J. N.; GONZALEZ-PADILLA, E. Synchronization and induction of estrus in heifers with a progestagen and estrogen. In: **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**. EDP Sciences, 1975. p. 255-262.

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