



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

INDUÇÃO DE DUPLA OVULAÇÃO EM FÊMEAS NELORE x ANGUS (*BOS INDICUS* x *BOS TAURUS*)

CLÁUDIO FELLIPE ROCHA DE QUEIROZ

Chapadinha, Ma
2019



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



CLÁUDIO FELLIPE ROCHA DE QUEIROZ

**INDUÇÃO DE DUPLA OVULAÇÃO EM FÊMEAS
NELORE x ANGUS (*BOS INDICUS* x *BOS TAURUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal do Maranhão, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José de Ribamar Souza Torres Júnior

Chapadinha, Ma
2019



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Queiroz, Cláudio Felliipe Rocha de.

Indução de dupla ovulação em fêmeas Nelore x Angus Bos indicus x Bos Taurus / Cláudio Felliipe Rocha de Queiroz. - 2019.

46 f.

Orientador(a): José de Ribamar Torres Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (25.06)/ccaa, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2019.

1. Biotecnologia. 2. Bovino de corte. 3. Gemelaridade. 4. IATF. 5. Onda folicular. I. Júnior, José de Ribamar Torres. II. Título.



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



CLÁUDIO FELLIPE ROCHA DE QUEIROZ

**INDUÇÃO DE DUPLA OVULAÇÃO EM FÊMEAS
NELORE x ANGUS (*BOS INDICUS* x *BOS TAURUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: 06/06/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José de Ribamar Torres Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Zinaldo Firmino da Silva
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



RESUMO

As taxas de natalidade e desmame são reconhecidas como os principais indicadores para mensurar a eficiência reprodutiva em bovinos de corte. O número de bezerros nascidos pode ser aumentado por meio de protocolos de indução de gestações gemelares. Objetivando verificar o efeito da gonadotrofina coriônica equina (eCG) na indução de dupla ovulação de fêmeas bovinas, 78 vacas multíparas $\frac{1}{2}$ sangue Nelore x Angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*) foram submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação à base de progesterona + estradiol, adicionado de diferentes doses de eCG (300 vs 1.000 vs 1.200 UI) administradas em diferentes dias do protocolo (implante 8 dias + eCG no D6 vs implante 9 dias + eCG no D7). Não houve efeito da dose de eCG no diâmetro folicular e nem no momento das ovulações dos folículos dominantes e subordinados. O número de ovulações foi maior nos tratamentos com doses de 1.000 e 1.200 UI nos animais tratados com eCG no D6 do protocolo (grupo CIDR 8), enquanto que naqueles que receberam eCG no D7 não houve diferença no número de ovulações em relação aos tratamentos. O maior percentual de ovulações duplas e múltiplas foi encontrado nos tratamentos eCG 1.000 e eCG 1.200 respectivamente no grupo CIDR 8 dias. Tanto no protocolo CIDR 8 quanto no protocolo CIDR 9 houve efeito significativo da dose de eCG no número de fetos aos 40 dias pós IATF. As taxas de prenhez decresceram proporcionalmente ao aumento da dose nos tratamentos eCG 300 [76,9% (20/26)], eCG 1.000 [57,7 % (15/26)] e eCG 1.200 [38,5% (10/26)], respectivamente; $P= 0,02$). O uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em doses de 1.000 e 1.200 UI aumenta a ocorrência de duplas ovulações, mas reduz as taxas de prenhez e aumenta a ocorrência de múltiplas ovulações em fêmeas *Bos indicus* x *Bos taurus* em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo, sendo, portanto, não recomendado como método para aumentar a eficiência na produção de bovinos de corte.

Palavras-chave: bovino de corte, biotecnologia, gemelaridade, IATF, onda folicular,



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



ABSTRACT

Birth and weaning rates are recognized as the main indicators for measuring reproductive efficiency in beef cattle. The number of calves born can be increased by protocols for inducing twin pregnancies. To verify the effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) on induction of double ovulation, 78 multiparous Nelore x Angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cow were submitted to E2+P4-based ovulation synchronization protocol, with different doses of eCG (300 vs 1,000 vs 1,200 IU) administered on different days of the protocol (Progesterone device for 8 days + eCG at D6 vs Progesterone device for 9 days + eCG at D7). There was no effect of the eCG dose on follicular diameter nor in ovulation time of the dominant and subordinate follicles. The number of ovulations was higher in 1,000 and 1,200 IU treatments in cows treated with eCG at the D6 of the protocol (group CIDR 8), whereas in those receiving eCG at D7 there was no differences in the number of ovulations. The highest percentage of double and multiple ovulations was found in treatments eCG 1,000 and eCG 1,200 respectively in the CIDR 8 protocol. Both in the CIDR 8 and in the CIDR 9 protocols there was a significant effect of the eCG dose on the number of fetuses at 40 days after TAI. Pregnancy rates declined in the same proportion as the dose increases in the eCG 300 [76.9% (20/26)], eCG 1,000 [57.7% (15/26)] and eCG 1,200 [38.5% (10 / 26)] treatments, respectively; $P = 0.02$). Finally, we conclude that the use of equine chorionic gonadotrophin (eCG) at doses of 1,000 and 1,200 IU increases double ovulations but reduces pregnancy rates and increases the multiple ovulations in *Bos taurus* x *Bos indicus* cows submitted to TAI. Therefore, it is not recommended as a method to increase the efficiency of beef cattle production.

Key words: beef cattle, biotechnology, FTAI, follicular wave, twinning



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



**“Acredite em si próprio e chegará um dia em que os outros não terão outra escolha
senão acreditar com você.”**

Cynthia Kersey

Ao Grande Arquiteto do universo, aos meus pais, minha esposa e meus filhos.

DEDICO



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



AGRADECIMENTOS

Ao meu Grandioso Deus, por sempre guiar meus passos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal Universidade Federal do Maranhão, em especial aos professores e funcionários, pelos conselhos e aprendizado concedido.

Ao Professor Torres pela orientação, confiança e paciência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência animal, pelos grandes ensinamentos repassados.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência animal, pelo apoio, amizade e concessão de conhecimento.

Ao grupo LAPIVE, em nome de Diego, Itamara, Lucas e Gabriela pelo apoio e ajuda em todos os momentos do experimento.

À Zoetis pela ajuda no experimento através do fornecimento de todos os fármacos utilizados.

Ao Médico Veterinário Juliano Budel, pelo apoio em todas as fases do experimento.

Ao senhor Francisco (Fazenda Maravilha) e Mauronir (Fazenda Monalisa).

Aos meus pais, Cláudio Nazareno e Onister Rocha, por terem me concedido a melhor herança, a educação. À minha esposa Elcilande de Queiroz, pela paciência e companheirismo. Aos meus filhos, minhas fontes de inspiração.

Meus honrosos agradecimentos.



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Representação esquemática dos protocolos hormonais utilizados com três tratamentos de doses diferentes de eCG (CIDR 9 DIAS + eCG D7 - Tratamentos 300 UI, 1.000 UI, 1.200 UI vs CIDR 8 + eCG D6 - Tratamentos 300 UI, 1.000 UI, 1.200 UI)	12
Tabela 1- Efeito do tratamento com diferentes doses de eCG na dinâmica folicular, ovulação e ocorrência de gestações múltiplas em vacas <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e benzoato de estradiol. Balsas, Maranhão – 2018	15
Tabela 2- Efeito do tratamento com diferentes doses de eCG nas taxas de ovulação e prenhez em vacas <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e benzoato de estradiol. Balsas, Maranhão – 2018	17



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Protocolo hormonal CIDR 8 dias com diferentes doses de eCG, e acompanhamento com ultrassom à partir do dia 6 até o dia 18.5	11
Figura 02- Protocolo hormonal CIDR 9 dias com diferentes doses de eCG, e acompanhamento com ultrassom à partir do dia 7 até o dia 18	11



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
BR 222, Km 4, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 e-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



LISTA DE SIGLAS

BE – Benzoato de estradiol
CIDR – Dispositivo intravaginal de progesterona
CL – Corpo Lúteo
ECC – Escore de Condição Corporal
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP – Cipionato de Estradiol
ETR- Escore do trato reprodutivo
E₂ – Estradiol
FD – Folículo Dominante
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA – Inseminação Artificial
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
LH – Hormônio Luteinizante
P₄ – Progesterona
PGF_{2α} – Prostaglandina F₂alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Eficiência reprodutiva x produtividade em bovinos de corte	2
2.2 Ciclo estral e dinâmica folicular em uníparas	4
2.3 Farmacodinâmica da gonadotrofina coriônica equina (eCG)	6
2.4 Métodos para obtenção de gestações gemelares em bovinos	7
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo Geral	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Local e Animais experimentais	10
4.2 Protocolos de Sincronização e Delineamento Experimental	10
4.3 Avaliações Ultrassonográficas	12
4.4 Análise Estatística	13
5 RESULTADOS	14
5.1 Dinâmica folicular em vacas <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i> tratadas com diferentes doses de eCG	14
6 DISCUSSÃO	19
7 CONCLUSÃO	22
7 REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que influenciam a produtividade de um rebanho. Entretanto, ao se analisar indicadores de eficiência reprodutiva expressos pela taxa de natalidade, pode-se verificar que a taxa média do rebanho brasileiro está situada em torno de 60% (ANUALPEC, 2009; FERRAZ e FELÍCIO, 2010). Segundo Gottschall (2008), o índice satisfatório situa-se entre 75 a 80% de natalidade. Trabalhos técnicos e econômicos (HOLMES, 1989; ROVIRA, 1996; BERETTA et al. 2001) comprovam que as mudanças tecnológicas na bovinocultura de corte devem ser realizadas com enfoque no aumento da taxa de natalidade. Devido ao grande mercado competitivo e ao grande aumento nos custos de produção, a exigência de alta produtividade é fundamental para o sucesso na pecuária mundial.

Diferentes técnicas de manejo hoje em dia são adotadas objetivando melhorar os índices de produção da pecuária nacional, entre elas podemos citar o emprego de biotecnologias da reprodução animal, tais como: a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV).

Atualmente existem técnicas para sincronizar o crescimento de folículos presentes nos ovários e com isso promover a sincronização de uma ovulação, garantindo assim o sucesso da inseminação artificial em tempo fixo. A IATF pode alcançar taxas de gestação que variam de 40 a 60% na primeira inseminação pós-parto, sem a necessidade de detecção do estro (BARUSELLI et al., 2006). A taxa de gestação e/ou o número de bezerros nascidos podem ser aumentados com a utilização da IATF, associada protocolos de indução de gestações gemelares. Davis et al. (1989) afirmaram que o aumento na incidência de partos gemelares em bovinos de corte aumenta a eficiência na produção de carne na ordem de 20 a 25%. Mee (1991) relatou que a produção de gêmeos é uma opção rápida para se incrementar a eficiência econômica de fêmeas bovinas de rebanhos de corte, sem que se aumente o número de matrizes do plantel. O controle endógeno da reprodução em bovinos é exercido pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, com participação fundamental dos hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Luteinizante (LH) (MORAN et al., 1989). A administração exógena de gonadotrofina coriônica equina (eCG), tem se mostrado bastante eficiente em bovinos, uma vez que esta molécula se liga tanto a receptores de FSH quanto de LH dos folículos e também aos receptores de LH do corpo lúteo (STEWART, 1981), podendo ser utilizada para induzir ovulações duplas

(MARTINEZ et al., 2014), múltiplas (BARUSELLI et al., 2008), ou mesmo para potencializar o crescimento folicular final e luteinização (SÁ FILHO et al., 2011b).

Neste contexto, visando aumento da produção de arrobas de carne ao desmame e maior eficiência econômica do sistema de cria em bovinos, é essencial se estudar a viabilidade técnica da adequação de protocolos hormonais para indução de duplas ovulações, objetivando obtenção de gestações gemelares em bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA X PRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE

A economia do setor agropecuário vem exigindo dos produtores maior eficiência produtiva, para que se mantenham na atividade. Entre os aspectos produtivos que devem ser trabalhados em uma empresa agropecuária voltada à produção de gado de corte, a reprodução aparece sempre em primeiro plano. A eficiência reprodutiva pode ser caracterizada pela produção anual de um bezerro por cada matriz. Porém, o prolongado período de anestro pós-parto que vacas normalmente apresentam, sobretudo as zebuínas (MENEGUETTI, 2006) acabam distanciando a média nacional desta realidade.

As taxas de natalidade e desmame são reconhecidas como os principais indicadores para mensurar a eficiência reprodutiva em bovinos de corte. Quanto maior o número de animais nascidos, menores forem as perdas devidas a mortalidade e mais precoce for a idade ao abate, maior será o desfrute de animais e a eficiência produtiva do rebanho (FIELDS et al., 2002).

Gottschall (2008) afirma que um importante ponto de estrangulamento na bovinocultura de corte voltada à cria resume-se ao baixo número de bezerros desmamados em relação ao número de matrizes inseminadas. De forma teórica, o objetivo deveria ser a produção e o desmame de um bezerro/vaca/ano, porém devido à uma série de fatores tais como anestro pós-parto, nutrição, sanidade, níveis de estresse, idade, estação do ano, presença de touro, entre outros acabam impedindo que se alcance esse objetivo (GODOY et al., 2004).

Diversas práticas de manejo, tais como o desmame antecipado, a suplementação estratégica dos bezerros ou vacas e o estabelecimento de um período de monta, podem

ser utilizadas para auxiliar o produtor na busca de uma melhor eficiência do sistema de cria. Dentre as práticas de manejo citadas, podemos dizer que o estabelecimento da estação de monta merece um destaque especial, pois ajuda a disciplinar as demais atividades de manejo, além de também fazer com que o período de maior oferta de alimentos de qualidade se ajuste àquele de maior demanda nutricional por parte dos animais, de forma a reduzir os custos com a suplementação, quando necessária (VALLE et al. 1998)

A adoção da estação de monta, além de otimizar a utilização da forragem, ainda contribui organizando o tempo disponível para outras atividades dentro da fazenda, tais como controle zootécnico e calendário sanitário, dentre outras tarefas rotineiras essenciais. Apresenta também a vantagem de padronizar os lotes de bezerros e aumentar o seu peso ao desmame. Assim, é possível maximizar recursos e o cronograma de trabalho, embutindo ganhos operacionais e econômicos significativos (TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

A duração da estação de monta também é importante para se verificar a precocidade e a fertilidade das fêmeas. Tal período não deve ultrapassar 90 dias para vacas e 60 dias para novilhas, pois nestes casos as fêmeas terão chance suficiente de apresentar entre 2 e 4 estros férteis e se tornarem gestantes (VALLE et al., 2000).

O índice reprodutivo é representado quando se leva em consideração o número de vacas gestantes em relação às inseminadas. Contudo, percentual de bezerros desmamados é um dos fatores de maior importância entre os que determinam a lucratividade do sistema de cria. Esse valor é definido como o percentual de todas as fêmeas em idade reprodutiva que, após um período de monta e de parição, desmamaram um bezerro saudável (CORREA et al., 2000).

Com a evolução e o estabelecimento da técnica de IA convencional, os problemas, como detecção de estros, baixo número de animais inseminados e principalmente a necessidade de mão de obra em tempo integral, conduziram à busca por alternativas para contorná-los, sem comprometer os índices reprodutivos (BARUSELLI et al., 2004). Assim, surgiram as técnicas de sincronização de estro/ovulação que permitem a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e possibilitam inseminar um grande número de animais (mais de 400 inseminações/dia) no momento mais apropriado aos técnicos e produtores, sem a necessidade de observar os estros (AYRES et al., 2006; TORRES-JÚNIOR et al., 2007).

Alguns protocolos hormonais auxiliam na indução de atividade ovariana cíclica e, devido à sincronização da ovulação, permitem empregar o uso da IATF, o que facilita o manejo e aperfeiçoa o emprego desta biotecnologia. O aprimoramento de um sistema de IATF teria como principais características: alta resposta em estros; alto grau de sincronização da onda folicular; alta taxa de concepção e vantajosa relação custo/benefício que, quando aplicadas às condições extensivas de criação de gado de corte, viabilizam a utilização da IA em grande escala (CARVALHO, 2004).

2.2 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM FÊMEAS UNIPARAS

Na fêmea bovina o ciclo estral é controlado por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero e por mecanismos intraovarianos que estabelecem uma dinâmica folicular a qual permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular em momento propício e produzir assim, uma célula capaz de ser fecundada (CALLEJAS, 2001).

Em média o ciclo estral dos bovinos tem a duração de 21 dias determinado pela função regular dos ovários. Alterações no córtex ovariano como crescimento, atresia, ovulação dos folículos, manutenção e regressão do corpo lúteo (CL) ocorrem durante o ciclo estral, que conta com a participação de vários hormônios tais como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) de origem hipotalâmica, os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que provêm da adenohipófise e, os esteroides sexuais ovarianos, que são o estradiol (E2) e a progesterona (P4) (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O GnRH é produzido no hipotálamo e atinge a hipófise anterior via sistema porta hipotalâmico-hipofisário, estimulando a liberação dos hormônios gonadotróficos: FSH e LH (BARUSELLI et al., 2004). Estes irão atuar nos ovários, sendo o FSH responsável pelo crescimento dos pequenos folículos (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1997; WEBB et al., 2004), enquanto que o LH atua no desenvolvimento final e ovulação do folículo dominante (FD) (GINOTHER et al., 1998; MIHM & AUSTIN, 2002; WEBB et al., 2004).

O ciclo estral é dividido em duas fases: a fase estrogênica que se estende do proestro ao estro, resultando na ovulação, e a luteínica ou progesterônica que envolve o metaestro e o diestro, encerrando-se com a luteólise (Reis, 2004). Essas fases, além de expressarem mudanças na mucosa vaginal tais como a presença de células nucleadas,

leucócitos e células cornificadas em cada período, exibem também variações nas concentrações hormonais de esteroides gonadais e, conseqüentemente, de gonadotrofinas. Em associação a essas mudanças cíclicas é possível observar alterações comportamentais, como por exemplo o estro, período no qual as fêmeas expressam libido e aceitam a monta (GONZÁLEZ, 2001).

Normalmente, o ciclo estral é composto por duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas, sendo que apenas na última onda ocorre a ovulação (BINELLI et al., 2006). O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos que culmina com o desenvolvimento do folículo ovulatório é chamado de dinâmica folicular (LUCY et al., 1992).

Existem três fenômenos em cada onda folicular caracterizados do ponto de vista morfológico e endócrino, que são a emergência/recrutamento, seleção/desvio/divergência e dominância folicular, onde as gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, atuam na manifestação, manutenção e suspensão destes eventos (GINTHER et al., 1996). Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Nesse momento, os folículos apresentam diâmetro em torno de 4 mm, sendo responsivos e dependentes de altas concentrações de FSH, o que possibilita a proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade estrogênica (GINTHER et al., 2002).

Destes, apenas um folículo continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros entram em processo de atresia (folículos subordinados) estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular (LUCY et al., 1992).

Após a divergência, o folículo dominante (FD) de uma onda pode percorrer dois caminhos possíveis. O primeiro é que na presença de altas concentrações de P4, devido à presença de um corpo lúteo que promove redução da frequência na pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH), o folículo dominante torna-se anovulatório (LUCY et al., 1992), devido ao processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989). Esse processo dura em torno de 1 a 2 semanas. Diante desse fato, ao observar o ovário por ultrassonografia infere-se que dos folículos visíveis, cerca de 85% deles já estejam em processo de atresia (MERTON et al., 2003). O segundo caminho, que é a ovulação, somente é possível caso ocorra a luteólise pois, deste modo, sob crescente frequência e amplitude nos pulsos de LH, o FD

tem suporte endócrino para o seu crescimento final e ovulação. Caso não haja fertilização do oócito ovulado, o ciclo se repetirá (BINELLI, et al, 2006).

O diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório em zebuínos está em torno de 10 a 12 mm (FIGUEIREDO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; BORGES et al., 2003), menor do que o frequentemente relatado para taurinos (15 a 20 mm) (MURPHY et al., 1990; ADAMS et al., 1993; ROBERTS et al., 1994; WOLFENSON et al., 2004

2.3 FARMACODINÂMICA DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)

A eCG é um fármaco que possui meia-vida de aproximadamente 46 h, produzida nos cálices endometriais da égua prenhe, entre 40 e 130 dias de gestação, e é a única gonadotrofina capaz de se ligar tanto aos receptores de FSH como aos de LH, isto é, possui atividade folículo estimulante e luteinizante (MURPHY E MARTINUK, 1991). Assim, a eCG, ao se ligar aos receptores de FSH e LH do folículo, pode promover o crescimento, a maturação folicular e a ovulação (STEWART E ALLEN, 1981; BARUSELLI et al., 2008). A eCG também pode se ligar aos receptores de LH do corpo lúteo (CL) e, assim, promover um aumento das grandes células luteínicas, que são responsáveis por cerca de 80% da síntese de P4, conferindo-lhe maior volume e maior capacidade de produção de P4 (SOUZA ET AL., 2009), tanto que alguns autores têm apontado o uso da eCG como ferramenta potencial para melhorar as concentrações plasmáticas de P4 em ciclos estrais subsequentes à sua aplicação (Baruselli et al., 2000).

Situações em que as vacas encontram-se com baixo escore corporal, em puerpério, ou que sejam vacas primíparas, acabam levando a inseminação artificial em tempo fixo a resultados insatisfatórios (BARUSSELI et al., 2008). O uso de eCG na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, é bastante interessante, haja visto que ele é capaz de proporcionar um aumento no crescimento final do folículo e maior taxa de ovulação e de concepção (BARUSELLI et al., 2004; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; PERES et al., 2009; SALES et al., 2011). Outra característica bastante marcante da eCG é sua capacidade de estimular células da teca e da granulosa no folículo dominante (CAMERON; BATT, 1991; KURAN; HUTCHINSON; BROADBENT, 1996), aumentando a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, (BARUSELLI et al., 2004), e assim promovendo um ambiente uterino e endócrino mais adequado para o embrião (PERES et al., 2009).

2.4 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE GESTAÇÕES GEMELARES EM BOVINOS

Diversos são os métodos utilizados para indução de gestações gemelares em bovinos. No entanto, é necessário entender alguns mecanismos fisiológicos envolvendo a ação de hormônios em biotecnologias reprodutivas, que estão diretamente relacionados a ocorrência de fenômenos como a codominância folicular e a múltipla ovulação.

O processo de seleção folicular é caracterizado por um desvio na taxa de crescimento entre o folículo maior (dominante em desenvolvimento) e os folículos menores (subordinados) de uma onda, que é um evento também denominado desvio de diâmetro (GINTHER ET AL., 1997; GASTAL et al., 1999). O mecanismo de desvio de diâmetro em espécies monovulatórias, incluindo bovinos, permite um folículo tornar-se dominante e ovular. Entretanto, de maneira ocasional, dois ou mais folículos dentro da mesma onda se tornam dominantes, resultando em codominância folicular (KULICK et al. 2001, BEG et al. 2003, ACOSTA et al. 2005, LOPEZ et al., 2005).

Folículos codominantes podem resultar em múltiplas ovulações ou ovulação única ao sofrer dois desvios. O primeiro desvio ocorre quando o maior folículo é cerca de 6,5 mm (*Bos Indicus*) a 8,5 mm (*Bos taurus*) e é indicado pelo crescimento reduzido do terceiro maior folículo. O segundo desvio entre os folículos codominantes ocorre 36 a 50 horas após o primeiro desvio e está associado temporalmente com uma diminuição mais precipitada do FSH após o início do primeiro desvio (KULICK et al. 2001, BEG et al. 2003, ACOSTA et al. 2005).

Tem sido postulado que o mecanismo de desvio em bovinos pode ser estabelecido em menos de oito horas (GINTHER et al., 1999). Além disso, outros autores relataram que o mecanismo de desvio é estudado mais efetivamente quando os dados são normalizados para o início de desvio por causa da variação individual no intervalo de tempo entre a emergência e o desvio (GINTHER et al., 1997).

Uma vez esclarecido o fenômeno da codominância e sua influência direta na ocorrência das múltiplas ovulações, consequentemente podendo induzir gestações gemelares, se poderá entender melhor os mecanismos de ação FSH e eCG quando administrados em protocolos hormonais utilizados em biotecnologias reprodutivas para prover múltiplas ovulações e/ou gestações. Tentativas iniciais de usar tratamentos hormonais para induzir a gemação produziram nascimentos múltiplos maiores

indesejados (JOHNSON et al., 1975). Mais recentemente, a utilização de eCG em doses e dias de administração diferentes induziu a dupla ovulação (30%) em bovinos de corte submetidos a modificações estratégicas do protocolo Ovsynch, afetando também a dinâmica folicular e as taxas de prenhez (MARTINEZ et al., 2014).

Muitos dos trabalhos publicados sobre a indução da gemelaridade foram realizados através de transferência de embriões (TE) utilizando embriões produzidos *in vivo* (OZIL, 1983; DAVIS et al., 1989). A produção de embriões *in vivo* é um processo que, a princípio, só tem justificada eficiência em animais de alto mérito genético, dado o seu elevado custo de produção (HORTA et al., 1993).

Um dos primeiros trabalhos publicados foi o de Rowson et al. (1969), no qual se pôde induzir a produção de gêmeos através da transferência de dois embriões. Estes mesmos autores, dois anos depois, relataram em outro trabalho que a transferência de um embrião para cada corno uterino de uma vaca não coberta ou de um segundo embrião para o corno contralateral ao corpo lúteo (CL) de uma vaca receptora que foi inseminada e fertilizada há poucos dias atrás é mais eficiente do que a simples ovulação para a produção de gêmeos em bovinos (ROWSON *et al.*, 1971).

Alguns anos depois, Anderson et al. (1976) testou a mesma metodologia de Rowson et al., (1969), transferindo dois embriões, um para cada corno uterino de novilhas sincronizadas, no qual obteve resultado de 75% de prenhez e destas 53% ficaram prenhes de gêmeos.

Outros trabalhos com o objetivo de induzir a gemelaridade foram testados, porém, com uma metodologia diferente. Ao se adotar a sistemática de se fazer a IA mais a TE depois de 7 dias, há a tendência de o índice de gestação ser mais elevado do que o simples implante de embriões (SUZUKI *et al.*, 1996). Nesse sentido, Boland et al. (1976), realizaram um experimento com seis vacas receptoras, as quais foram inseminadas em estro natural e receberam, cinco dias após, um embrião no corno contralateral ao do CL. Destas, cinco se tornaram gestantes, e duas pariram gêmeos no período normal de gestação.

Contextualizando pesquisas anteriormente citadas, sabe-se que o conhecimento atual da fisiologia ovariana e do desenvolvimento folicular, suportados pelo domínio das biotécnicas e farmacologia da reprodução, podem resolver questões relacionadas à indução hormonal de duplas ovulações e obtenção de gestações gemelares.

3. OBJETIVO

- Verificar a eficiência da gonadotrofina coriônica equina (eCG) na indução de dupla ovulação de fêmeas múltiparas *Bos Indicus x Bos Taurus* submetidas a protocolos de IATF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local e Animais Experimentais

O experimento foi conduzido em uma propriedade rural localizada no município de Balsas, Estado do Maranhão, Brasil, no mês de janeiro de 2018, durante o período chuvoso do ano. Foram utilizadas respectivamente 78 vacas multíparas ½ sangue Nelore x Angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Os animais foram previamente selecionados, de acordo com o período pós-parto (entre 30 e 60 dias) e quanto ao escore de condição corporal (ECC) utilizando-se uma escala de um a cinco pontos, conforme metodologia de Machado et al. (2008). Todas as fêmeas utilizadas tinham peso corporal acima de 380 kg e ECC ≥ 3 . Também foi determinado escore do trato reprodutivo (ETR), por meio de ultrassonografia, seguindo metodologia adaptada de Gutierrez et al. (2014), na qual as fêmeas foram classificadas como: **ETR 1** = Fêmeas ciclando, com presença de CL em um dos ovários; **ETR 2** = Fêmeas com ausência de CL e presença de folículos em fase de dominância ($\geq 8,0$ mm de diâmetro) e; **ETR 3** = Fêmeas com ausência de CL e presença apenas de folículos que não chegam até a divergência ($<8,0$ mm de diâmetro).

As fêmeas foram bloqueadas em diferentes tratamentos experimentais com base no ETR e, sincronizadas, tendo sua dinâmica folicular acompanhada por ultrassonografia bidimensional com transdutor linear transretal de 7,5 MHz (Mindray®, Modelo Z5Vet, Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System), conforme descrito nos itens adiante.

Os animais foram mantidos sob pastejo extensivo, durante o período chuvoso, em piquetes com volume forrageiro adequado de capim Mombaça (*Panicum maximum*) e Braquiária (*Urochloa brizantha*), recebendo suplementação mineral própria para a fase reprodutiva de vacas de corte em sistema de cria, à vontade no cocho, de acordo com as exigências de manutenção e produção fornecidas pelo NRC (2016).

4.2. Protocolos de Sincronização e Delineamento Experimental

Foram realizados protocolos para sincronização da ovulação, sendo que no dia zero (D0), todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 1,9g; CIDR®, Zoetis, Brasil) e foram administrados 2mg de benzoato de estradiol (BE; I.M.; Gonadiol®, Zoetis, Brasil). Os dispositivos intravaginais de P4 foram removidos no

dia 8 (D8) do grupo CIDR 8 dias (Figura 01) e no dia 9 (D9) do grupo CIDR 9 dias (Figura 02).

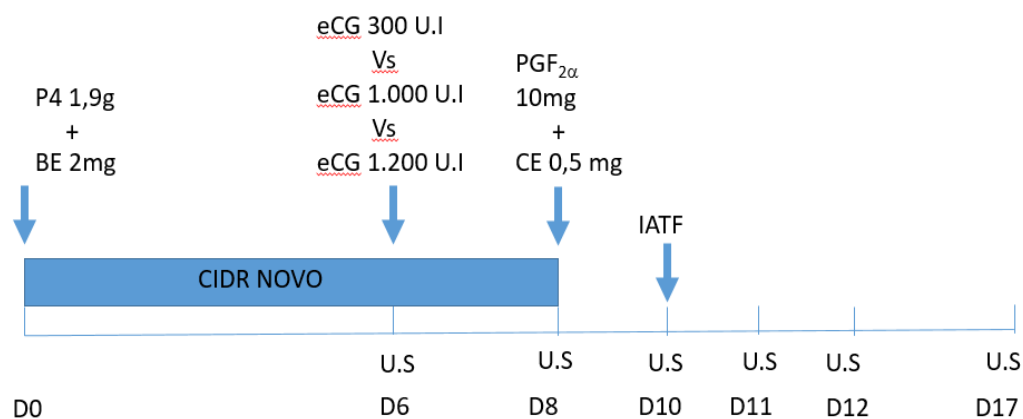


Figura 01: Protocolo hormonal CIDR 8 dias com diferentes doses de eCG, e acompanhamento com ultrassom à partir do dia 6 até o dia 18. **Legenda:** D= dia do protocolo; US= ultrassonografia; BE= benzoato de estradiol; eCG= gonadotrofina coriônica equina; CE= cipionato de estradiol; P4= progesterona; PGF_{2α} = dinoprost; IATF= Inseminação artificial em tempo fixo.

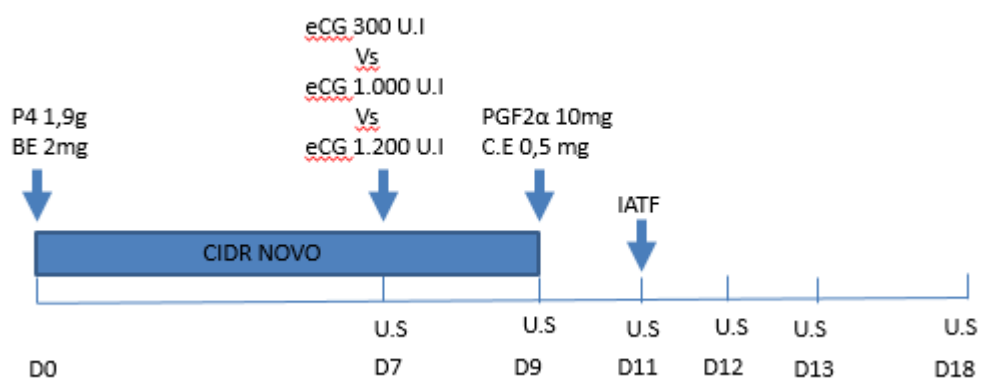


Figura 02: Protocolo hormonal CIDR 9 dias com diferentes doses de eCG, e acompanhamento com ultrassom à partir do dia 7 até o dia 18. **Legenda:** D= dia do protocolo; US= ultrassonografia; BE=benzoato de estradiol; eCG= gonadotrofina coriônica equina; CE= cipionato de estradiol; P4= progesterona; PGF_{2α}= dinoprost; IATF= Inseminação artificial em tempo fixo.

Na ocasião da remoção dos dispositivos de P4 administrou-se 10mg de Dinoprost i.m. (PGF_{2α}, Lutalyse®, Zoetis, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m. (CE, ECP®,

Pfizer, Brasil) em todos os animais. Quarenta e oito horas antes da retirada dos dispositivos intravaginais de P4 de cada protocolo (D6 ou D7), os animais foram novamente bloqueados com base no diâmetro do maior folículo ovariano e, em seguida, aplicadas doses de 300, 1.000 ou 1.200 UI de gonadotrofina coriônica equina i.m. (eCG; Novormon®, Zoetis, Brasil) em cada grupo seguindo uma distribuição homogênea para cada tratamento (n=13) (Quadro 1). Quarenta e oito horas após a retirada dos dispositivos intravaginais de P4 de cada protocolo (D10 ou D11) as vacas foram inseminadas em tempo fixo.

O experimento foi desenhado em um delineamento em blocos ao acaso com arranjo fatorial 2x3, conforme ilustrado no Quadro 1.

Protocolos	Tratamentos	n
CIDR 8 DIAS + eCG D6	300 UI (controle)	13
	1.000 UI	13
	1.200 UI	13
CIDR 9 DIAS + eCG D7	300 UI (controle)	13
	1.000 UI	13
	1.200 UI	13

Quadro 1. Representação esquemática dos protocolos hormonais utilizados com três tratamentos de doses diferentes de eCG (CIDR 9 DIAS + eCG D7 - Tratamentos 300 UI, 1.000 UI, 1.200 UI vs CIDR 8 + eCG D6 - Tratamentos 300 UI, 1.000 UI, 1.200 UI).

4.3. Avaliações ultrassonográficas

Avaliações ultrassonográficas dos ovários (dinâmica folicular ovariana) foram realizadas afim de se quantificar e mensurar os folículos dominantes e os seus subordinados, no momento da administração da eCG, retirada dos dispositivos de P4, inseminação artificial e, a partir daí, a cada 24 horas até que cada vaca ovulasse todos os folículos ≥ 10 mm, limitando-se a 96 horas após a inseminação. Aos sete dias após as inseminações (D17 ou D18), foi realizado um novo exame ultrassonográfico, para se quantificar e mensurar os corpos lúteos resultantes das ovulações (Figuras 1 e 2).

4.4 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (versão 9.4. SAS Inst. Inc., Cary, NY). A normalidade dos resíduos para cada variável foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE do SAS) e as variáveis dependentes foram todas consideradas de distribuição não-normal. As variáveis contínuas foram, a priori, analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY do SAS). Para as variáveis nas quais se observou significância estatística no teste de Kruskal-Wallis, procedeu-se *“análise a posteriori”* para múltiplas comparações, por meio do KW-MC MACRO do SAS (Elliot e Hynan, 2011), aplicando-se o teste de Nemenyi (Nemenyi, 1963), indicado como *post-hoc test* para comparação entre tratamentos com número igual de amostras. As variáveis de distribuição binomial foram analisadas pelo teste Exato de Fisher com auxílio do software GraphPad InStat®. As variáveis classificatórias consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram: animal, tratamento, dias de permanência do implante de P4 e dose de eCG. O nível de significância adotado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, se considerou que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

5 RESULTADOS

5.1 Dinâmica folicular em vacas *Bos Indicus x Bos Taurus*, tratadas com doses diferentes de eCG

A administração de eCG nas doses de 1.000 e 1.200 UI não interferiu no diâmetro folicular e nem no momento das ovulações, tanto nos folículos dominantes, quanto nos subordinados (Tabela 1). O número de ovulações foi maior nos tratamentos com doses de 1.000 e 1.200 UI ($2,3 \pm 0,4$ vs $3,2 \pm 0,7$, respectivamente; $P < 0,05$) em relação ao controle (300 UI) nos animais tratados com eCG no D6 do protocolo (grupo CIDR 8), enquanto que naqueles que receberam eCG no D7 não houve diferença no número de ovulações em relação aos tratamentos. Tanto no protocolo CIDR 8 quanto no protocolo CIDR 9 houve efeito significativo da dose de eCG no número de fetos aos 40 dias pós IATF (tabela 01).

TABELA 01- Efeito do tratamento com diferentes doses de eCG na dinâmica folicular, ovulação e ocorrência de gestações múltiplas em vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e benzoato de estradiol. Balsas, Maranhão – 2018

Variáveis	Tratamentos						Efeitos principais	
	CIDR 8 dias			CIDR 9 dias			Valor de P	
	eCG300	eCG1.000	eCG1.200	eCG300	eCG1.000	eCG1.200	Dias CIDR	Dose eCG
n amostral	13	13	13	13	13	13	---	---
Diâmetro FD no dia da eCG (mm)	89,3±5,1	89,1±7,1	89,8±7,3	92,7±5,4	92,3±4,8	92,7±4,1	0,30	0,90
Diâmetro FS1no dia da eCG (mm)	64,4±6,0	66,2±5,5	59,2±3,5	69,4±3,7	71,7±3,8	67,1±4,3	0,07	0,24
Diâmetro FS2no dia da eCG (mm)	-	-	-	-	-	-	-	-
Diâmetro FD no dia da IATF (mm)	128,0±9,7 ^{ab}	139,1±6,8 ^{ab}	120,3±5,5 ^b	141,0±4,3 ^{ab}	154,5±8,2 ^a	151,0±9,3 ^a	0,003	0,34
Diâmetro FS1 no dia da IATF (mm)	88,0±9,2	110,6±5,0	117,1±7,2	109,0±11,4	106,8±8,0	110,5±6,6	0,63	0,16
Diâmetro FS2 no dia da IATF (mm)	88,2±19,2 ^{ab}	87,1±6,3 ^b	101,6±4,5 ^a	93,0±0 ^{ab}	98,9±5,6 ^{ab}	105,7±10,2 ^a	0,30	0,14
Número de ovulações	1,0±0,4 ^b	2,3±0,4 ^a	3,2±0,7 ^a	1,1±0,1 ^{ab}	1,5±0,3 ^{ab}	2,2±0,6 ^{ab}	0,20	0,001
Momento da 1º ovulação *	60,0±0	60,0±0	63,7±2,5	60,0±0	60,0±0	60,0±0	0,14	0,17
Momento da ovulação do FD *	60,0±0	60,0±0	63,7±2,5	60,0±0	60,0±0	60,0±0	0,14	0,17
Momento da ovulação do FS1 *	60,0±0	60,0±0	63,0±3,0	72,0±12,0	60,0±0	60,0±0	0,70	0,15
Momento da ovulação do FS2 *	84,0±0	69,0±9,0	66,9±4,4	-	60,0	60,0±0	0,20	0,28
Núm. folículos anovulatórios	0,1±0,1	0,8±0,8	1,3±0,5	0,2±0,1	0,8±0,4	0,1±0,1	0,67	0,30
Fetos por gestação aos 40 dias após IATF	1,0±0,0 ^b	1,8±0,3 ^a	3,0±0,0 ^a	1,1±0,1 ^b	1,4±0,2 ^{ab}	1,8±0,3 ^a	0,44	0,0004

^{abc} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis-Nemenyi ao nível de 5% de significância.

* Horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona.

Legenda: FD= folículo dominante; FS1= maior folículo subordinado; FS2=Segundo maior folículo subordinado; eCG= gonadotrofina coriônica equina; IATF= inseminação artificial em tempo fixo; CIDR= dispositivo intravaginal de progesterona

O diâmetro folicular no dia da IATF foi maior nos animais tratados com CIDR por 9 dias. Esta foi uma resposta obviamente esperada, devido ao momento da IATF ser no décimo primeiro dia do protocolo (D11), portanto, 24 horas a mais em relação aos animais do tratamento CIDR 8 dias. Considerando os efeitos principais, houve efeito significativo da dose de eCG no número de ovulações e quantidade de fetos aos 40 dias de gestação ($P < 0,01$).

Conforme apresentado na Tabela 2, a taxa geral de ovulação não diferiu entre os tratamentos e o percentual de ovulações únicas foi superior no grupo controle nos animais que receberam eCG no D6. Nos animais tratados com eCG no D7 não houve diferença no percentual de ovulações únicas entre os tratamentos, contudo, houve diferença entre os tratamentos de acordo com o tempo de uso do CIDR, sendo que, no tratamento CIDR 8 dias, 38,2% (13/34) tiveram ovulação única, contra 69,4% (25/36) no tratamento CIDR 9 dias ($P = 0,01$). Analisando-se a mesma variável, constatamos que houve diferença entre os tratamentos eCG 300, 85,7% (18/21); eCG 1.000, 45,8% (11/24) e eCG 1.200, 36% (9/25) ($P = 0,001$).

Observou-se que também houve diferença entre as doses de eCG em relação às múltiplas ovulações: eCG 300, 4,8% (1/21); eCG 1.000, 29,2% (7/24); eCG 1.200, 44,0% (11/25) ($P = 0,007$).

TABELA 02. Efeito do tratamento com diferentes doses de eCG nas taxas de ovulação e prenhez em vacas *Bos taurus x Bos indicus* sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e benzoato de estradiol. Balsas, Maranhão – 2018

Variáveis	Tratamentos						Efeitos principais	
	CIDR 8 dias			CIDR 9 dias			Valor de P	
	eCG300	eCG1.000	eCG1.200	eCG300	eCG1.000	eCG1.200	Dias CIDR	Dose eCG
n amostral	13	13	13	13	13	13	---	---
Taxa de ovulação %	69,2(9/13)	92,3(12/13)	100(13/13)	92,3(12/13)	92,3(12/13)	92,3(12/13)	0,71	0,14
Ovulação única %	88,9(8/9) ^a	16,7(2/12) ^b	23,1(3/13) ^b	83,3(10/12) ^a	75,0(9/12) ^a	50,0(6/12) ^{ab}	0,01	0,001
Ovulação dupla %	0,0(0/9) ^b	50,0(6/12) ^a	15,4(2/13) ^{ab}	25,0(3/12) ^{ab}	8,3(1/12) ^{ab}	16,7(2/12) ^{ab}	0,57	0,40
Mútiplas ovulações %	11,1(1/9) ^{ab}	41,7(5/12) ^a	53,8(7/13) ^a	0,0(0/12) ^b	16,7(2/12) ^{ab}	33,3(4/12) ^{ab}	0,07	0,007
Prenhes/inseminadas %	69,2(9/13) ^a	46,2(6/13) ^{ab}	23,1(3/13) ^b	84,6(11/13) ^a	69,2(9/13) ^a	53,8(7/13) ^{ab}	0,07	0,02

^{abc} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ao nível de 5% de significância.

Legenda: eCG= gonadotrofina coriônica equina; CIDR= dispositivo intravaginal de progesterona

O maior percentual de ovulações duplas e múltiplas foi encontrado nos tratamentos eCG 1.000 e eCG 1.200 respectivamente no grupo CIDR 8 dias. Houve diferença significativa em relação às taxas de prenhez, que decresceram proporcionalmente ao aumento da dose nos tratamentos eCG 300 [76,9% (20/26)] eCG 1.000 [57,7 % (15/26)] e eCG 1.200 [38,5% (10/26)], respectivamente; P= 0,02).

6 DISCUSSÃO

Verificou-se o efeito da eCG em promover o desenvolvimento de mais de um folículo ovulatório, de modo dose-dependente, sobretudo quando os animais receberam eCG no dia 6 do protocolo, ou seja, 2,5 dias após a emergência de onda folicular. Nos animais que receberam eCG no D7 não houve diferença no número de ovulações em relação ao controle, isto demonstra que no D6, até o terceiro dia do crescimento da onda folicular, os folículos subordinados podem ser selecionados para a fase LH-dependente com mais eficiência. Segundo Sartorelli et al. (2004), neste período é que está ocorrendo a divergência de uma nova onda folicular e assim consegue-se recrutar um maior número de folículos de acordo com o aumento da dose de eCG. Estes dados são confirmados por Gimenes et al. (2008) que descreveram a ocorrência do desvio folicular em torno de 2,5 dias após a ovulação em fêmeas Nelore, quando o folículo dominante havia alcançado 6,2 mm de diâmetro.

A eCG possui ação de FSH e em menor proporção de LH, e tem efeito positivo quando utilizado para estimular o crescimento de folículos no pós-parto, gerando folículos pré-ovulatórios maiores (MURPHY & MARTINUK, 1991). Ferraz Jr (2013) verificou uma taxa de ovulação dupla de 5,9 %, utilizando protocolo 5 dias com estrógeno. Segundo o autor, isto pode ter sido causado pela administração de eCG antes que ocorresse a divergência folicular. Sales et al. (2012) observaram que a utilização de BE ou ECP combinado com eCG (300 UI) em vacas Nelore, no dia 8 do protocolo de IATF causou, respectivamente, 4,8 e 4,2% de ovulação dupla (SALES et al., 2012). Tribulo et al. (2002) utilizaram 300 UI de eCG em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no dia 5 do protocolo, encontraram uma taxa de ovulação dupla de 2% apenas.

Trabalhos com transferência de embriões mostraram que a utilização de eCG (1.000 UI) no quarto dia após a sincronização da onda de desenvolvimento folicular com 5 mg de estrógeno, em novilhas holandesas, resultou em 2 a 5 CL's por animal (BÓ et al., 2002). Baruselli et al. (2001), em estudo semelhante com novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* tratadas com 800 UI de eCG no dia 5 do protocolo à base de BE-P4, resultou em 2,6 CL's por animal. Estes estudos mostram que o uso de eCG por volta do dia 5 do protocolo de sincronização pode levar à dupla ovulação, porém a dose de eCG utilizada isso é crucial na resposta ovariana. Nos estudos que obtiveram altas taxas de dupla ovulação, a dose de eCG utilizada foi cerca de 3 vezes maior que a convencional utilizada

em protocolos de IATF. Por outro lado, o uso de doses convencionais de eCG (até 400 UI) em protocolos para IATF, tanto na fase pré-divergência (D5) quanto na pós-divergência (D8) produzem ovulações únicas em sua maioria e alto índice de corpos lúteos ≥ 18 mm (89,4 vs 84,7% respectivamente) (NASSER et al., 2004).

Conforme apresentado nos resultados desta pesquisa, não houve diferença no percentual de ovulações únicas entre os tratamentos 300, 1.000 e 1.200 UI no grupo CIDR 9 dias, haja visto que a eCG foi aplicada no D7 do protocolo (3,5 dias após a emergência de onda folicular), período após o qual provavelmente a dominância já estava estabelecida, com o folículo dominante tendo em média 9,2 mm de diâmetro, resultando na estimulação e na ovulação de apenas um folículo em 75% e 50% das fêmeas tratadas com 1.000 e 1.200 UI de eCG, respectivamente. Em um estudo realizado com novilhas de corte *Bos taurus*, 100% das fêmeas com folículos dominantes entre 9 e 10 mm de diâmetro ovularam após indução de ovulação, enquanto que, naquelas com folículos na faixa de 8 mm, somente 50% ovularam (MARTINEZ et al., 2014), demonstrando que após a divergência folicular e aquisição da capacidade ovulatória pelo folículo dominante, a ovulação dos folículos subordinados é menos provável.

Segundo Gimenes et al. (2008), em novilhas *Bos indicus*, a capacidade ovulatória foi adquirida por folículos entre 7,0 e 8,4 mm e, após esta fase, a responsividade do folículo dominante ao estímulo ovulatório aumentou significativamente após este atingir um diâmetro de 8,5 mm. Este mesmo fato possibilitou que fosse verificado que as fêmeas do protocolo CIDR 8 dias, que tinham folículo dominante de 8,4 mm na ocasião da administração de eCG no D6 do protocolo, pudessem obter taxas de ovulações duplas em torno de 50% (1.000 UI) e múltiplas em torno de 53,8% (1.200 UI).

O tratamento cujo resultado mais contribuiu para obtenção de dupla ovulação foi a dose de 1.000 UI de eCG administrada no D6 do protocolo CIDR 8 dias, no qual se obteve 50% de duplas ovulações, com 46,2% de prenhez e 1,8 fetos por gestação. Estudos anteriores reportam taxas de ovulação dupla de 30% com aproximadamente 20% de gestações gemelares usando 800 UI de eCG no dia 3 do protocolo Ovsynch+progesterona (MARTINEZ et al., 2014). Nesta mesma pesquisa, os autores concluíram que a dose e o momento da administração de eCG baseados no estágio de desenvolvimento folicular, afetaram a dinâmica folicular a ponto de ocasionar resultados bastante distintos a cada nova tentativa de mudar o uso da eCG no protocolo Ovsynch+progesterona em busca de ovulações duplas.

Nesta pesquisa, no mesmo tratamento com 1.000 UI de eCG no D6 do protocolo CIDR 8 dias, obtivemos 15,4% de ovulações múltiplas, o que confere maior risco à manutenção da gestação. Estudos anteriores demonstraram que as tentativas iniciais de induzir múltiplas ovulações usando dose elevada de eCG eram bem sucedidas, porém o nascimento indesejado de trigêmeos era comum (JOHNSON et al., 1975). Em outro experimento constatou-se que doses elevadas de eCG (i.e., doses de 1500 e 2000 UI), foram capazes de resultar em múltiplas ovulações e nascimentos (TURMAN et al., 1971).

Também foi constatado que as taxas de prenhez foram proporcionalmente menores, quanto maiores a doses de eCG e, consequentemente, maior ocorrência de múltiplas ovulações. Acredita-se que pode haver consequências indesejadas do aumento excessivo da produção de estradiol após o uso de altas doses de eCG (SUDANO et al., 2009). Devido à longa meia-vida do eCG, os folículos ainda estão sendo estimulados após a ovulação e os níveis de estradiol permanecem altos. Concentrações elevadas de estradiol na fase lútea inicial podem efeitos deletérios no oviduto, diminuindo a fertilidade. Acredita-se que altos níveis de estradiol desencadeiam a cascata luteolítica induzida pela prostaglandina, alterando também a secreção de progesterona e LH. (CALLENSEN et al., 1989)

Em uma recente revisão, McMillan et al. (2018) descrevem haver associação entre múltiplas ovulações e o aumento das perdas gestacionais em bovinos. Em uma análise de quase 103 mil exames ultrassonográficos em 48 mil vacas de 658 rebanhos leiteiros irlandeses com predisposição genética para múltiplas ovulações, estas foram associadas a altos riscos de perdas gestacionais e atraso no retorno à atividade ovariana cíclica (CARTHY et al., 2015).

Em resumo, a dupla gestação pode ser uma ferramenta para aumentar a produção de carne em um rebanho de bovinos de corte. Em consequência disso, nosso interesse era promover um protocolo hormonal com uso da eCG, que pudesse ser utilizado para a produção de gêmeos. Porém, nosso objetivo de conseguir exclusivamente duplas ovulações, por meio do aumento da dose de eCG em protocolos convencionais a base de BE+P4 não foi alcançado, produzindo grande variabilidade na resposta folicular ovariana e uma significativa ocorrência de múltiplas ovulações.

7 CONCLUSÃO

O uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em doses de 1.000 e 1.200 UI aumenta a ocorrência de duplas ovulações, mas reduz as taxas de prenhez e aumenta a ocorrência de múltiplas ovulações em fêmeas *Bos taurus* x *Bos indicus* em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo, sendo, portanto, não recomendado como método para aumentar a eficiência na produção de bovinos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effects of modified FSH surges on follicle selection and codominance in heifers. **Animal Reproduction**, v.2, p.28-40, 2005.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.30, p.259-271, 1992.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180-187, 2010.

ALAN C. ELLIOTT, LINDA S. HYNAN. A SAS® macro implementation of a multiple comparison post hoc test for a Kruskal–Wallis analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine** 102 (2011) 75–80

ANDERSON, G.B.; BALDWIN, J.N.; CUPPS, P.T.; DROST, M.; HORTON, M.B.; WRIGHT, R.W.Jr. Induced twinning in beef heifers by embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v.43, p.272, 1976.

ANDREU-VÁZQUEZ, C.; GARCIA-ISPIERTO, I.; GANAUG, S.; FRICKE, P.M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of twinning on the subsequent reproductive performance and productive lifespan of high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v.78, 2061–2070, 2012a.

ANDREU-VÁZQUEZ, C.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-BEJAR, M., DE SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Clinical implications of induced twin reduction in dairy cattle. **Theriogenology**, v.76, 512–521, 2011.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S, PENTEADO, L.; SOUSA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com norgestomet e valerato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.408, 2006. Resumo.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F, BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI P.S., MARTINS C.M., SALES J.N.S., FERREIRA R.M. 2008. Recent advances in bovine superovulation. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36:433-448.].

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

BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETTO, C.G.A. Produtividade e Eficiência Biológica de Sistemas Pecuários de Cria Diferindo na Idade das Novilhas ao Primeiro Parto e na Taxa de Natalidade do Rebanho no Rio Grande de Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30 n.4, p.1278-1286, 2001.

BEEREPOOT, G.M.; DYKHUIZEN, A.A.; NIELEN, M.; SCHUKKEN, Y.H.; The economics of naturally occurring twinning in dairy cattle. **Journal Dairy Science**. v.75, 1044–1051, 1992.

BINELLI, M.; IBIAPINA B.T.; BISINOTTO R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, Sup. 1, p. 1-7, 2006.

BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology** 2014, 81, 38-48.

BÓ G A., BARUSELLI PS, MARTÍNEZ MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** 2003;78:307–26.

BÓ GA, BARUSELLI PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRÍBULO R, TRÍBULO H, MAPLETOFT RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53- 72, 2002.

BÓ, G. A et al. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 65, n. 1, p. 89-101, Jan. 2006.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J.; Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1559, 1994.

BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Birth of twin calves following a simple transcervical non – surgical egg transfer technique. **The Veterinary Record** n.99, p. 274-275, 1976.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R.; FONSECA, J.F.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A.J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.85-92, 2003.

CALLESEN, H.; BAH, A.; GREVE, B.; GOLFREDSEN, P.; HOLM, P. et al.; Hormonal parameters for evaluation of superovulated heifers. **Theriogenology**. 1989; 39:180.

CALLEJAS, S.S. Fisiología del ciclo estral bovino. In: PALMA, G.A..Biotecnología de la Reproducción. **Reprobiotec**, Argentina, cap. 4, p.37- 49, 2001.

CAMERON, A. W. N.; BATT, P. A. PMSG may directly stimulate ovulation in female goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 233-

239, July 1991.

CARTHY, T.R.; RYAN, D.P.; FITZGERALD, A.M.; EVANS, R.D.; BERRY, D.P. Genetic parameters of ovarian and uterine reproductive traits in dairy cows. **Journal. Dairy Science**. 2015, 98, 4095–4106.

CARVALHO, J. B. P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus*. 2004. 122f. **Tese (Doutorado em Reprodução Animal)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CAVALIERI, F.S.R. Viabilidade técnica de parto gemelar em fêmeas da raça nelore. 2008. 37p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Curso de pós Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2008.

CORREA, E. S. et al. Avaliação de um Sistema de Produção de Gado de Corte. 1. Desempenho Reprodutivo. **Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**. Viosa-mg, v. 29, n. 6, p. 2209-2215, 2000.

CURRAN, S.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. **Journal of the American Veterinary Medical Association** . v.189, p. 1295–1302, 1986.

DAVIS, M.E.; BISHOP, M.D. Induction of multiple births in beef cows with FSH: calving rate and subsequent performace. **Livestock production Science**, 32, 41-62, 1991.

DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT.; HAZEN, C. H. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *IN vitro* embryo Production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n.2, p.239-245, 2008.

DRION, P.V. et al. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p.207-215, 2001.

DYMNICKI, E.; REKLEWSKI, Z.; SLONIEWSKI, K.; WOJDAN, J. The possibility of obtaining twins in cattle using superovulation and embryo transfer. **Prace i Materiały Zootechniczne, Zeszyt Specjalny**, n.6, p.79-83, 1998.

ECHTERNKAMP, S.E.; GREGORY, K.E, Effects of twinning on gestation lenght, retained placenta, and dystocia. **Journal of Animal Science**, v.77, p.39-47, 1999.

FERNANDES, C.A.C.; OBA, E.; FERREIRA, A.M.; URIBE-VELAQUEZ, L.F.; VIANA, J.H.M. Taxa de ovulação e concentração plasmática de progesterona em fêmeas bovinas imunizadas com líquido folicular suíno. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.54, no.6, Belo Horizonte, Dec. 2002.

FERNANDES, C.A.C. Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a taxa de gestação de novilhas mestiças usadas como receptoras de embrião. 1994. 63f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - **An example from Brazil. Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FIELDS, M.J.; SAND, R.S.; YELICH, J.V. Factors affecting calf crop – **Biotechnology of Reproduction**. Boca Raton, USA. CRC PRESS, 2002.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FLORIANI, A. R. Efeito de progesterona e benzoato de estradiol na dinâmica folicular e produção *in vitro* de embriões bovinos. 2006. 40p. **Tese (Doutorado)** - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 648-654, Sept. 2001.

GARCÍA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J.L.; NOGAREDA, C.; LÓPEZ- BÉJAR, M.; DE RENSIS, F. Relationship between heat stress during the periimplantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, v.65, 799–807, 2006.

GASTAL, E.L.; BERGFELT, D.R.; NOGUEIRA, G.P.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biology and Reproduction**, v.61, p.1492-1498, 1999.

GIBBOS, J. R; WILTBANK, M. C; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 1066-1073, 1997.

GIMENES, L U, SÁ FILHO, M F, CARVALHO, N A T, TORRES-JÚNIOR, J.R.S., SOUZA, A. H., MADUREIRA, E. H., TRINCA, L. A., SARTORELLI, E. S., BARROS, C. M., CARVALHO, J. B. P., MAPLETOFT, R. J., BARUSELLI, P S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852 - 858, 2008.

GINTHER, O. J.; BEG, M.A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, p.475-482, 2002.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v 52 1079-1093, 1999.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of Dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

GODOY, M.M. de; ALVES, J.B.; MONTEIRO, A.L.G.; VALÉRIO FILHO, W.V. Parâmetros reprodutivo e metabólico de vacas da raça Guzerá suplementadas no pré e pós-parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.103-111, 2004.

GONZALEZ A, WANG H, CARRUTHERS TD, MURPHY BD, Mapletoft, RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Canadian Veterinary Journal** 1994, 35, 158-162.

GONSALVES, P.B. Transferência e Criopreservação de embriões Bovinos. In: REICHENBACH, H. D. et al. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2001. cap. 8, p.127-178.

GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v.33, p. 519-519, 1990.

GOTTSCHALL, C. S. Indicadores de Produtividade em Rebanhos de Bovinos de Corte e Leite. In: Bovinocultura – **PROMEvet – Programa de Atualização em Medicina Veterinária**. Artmed/ Panamericana Editora Ltda, 1ª ed. Porto Alegre. v. 1, p. 11-49, 2008.

GUERRA-MARTINEZ, P; DICKERSON, G.E.; ANDERSON, G.B.; GREEN, R.D. Embryo-transfer twinning and performance efficiency in beef production. **Journal of Animal Science**, v.68, p.4039-4050, 1990.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed. Barueri: Editora Manole, 2004. 513p.

HANRAHAN, J.P. The inter-ovarian distribution of twin ovulations and embryo survival in bovine. **Theriogenology**, v.20, p. 3–11, 1983.

HORTA A.E.M., MARQUES C.C., VASQUES M.I., LEITÃO R.M. E A.VAZ PORTUGAL. Indução de gestações gemelares em vacas de carne por transferência de

embriões produzidos invitro. **Proceedings do 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL SPRA**, Luso. II Vol., pp. 163-172. 1993

JOHNSON, M. R., E. J. TURMAN, AND D. F. STEPHENS. Gonadotropin induced multiple births in beef cows following estrus synchronization. **Journal of Animal Science**. 41:1394–1399, 1975.

HOLMES, P. R. The opportunity of a lifetime. Reproductive efficiency in the beef herd. Rahway: **MSDAGVET**, 1989. 34p.

KURAN, M.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 45, n. 1/2, p. 1-12, Dec. 1996.

LINDSELL, C. E.; RAJKUMAR, K.; MANNING, A. W.; EMERY, S.K.; MAPLELOFT, R.J.; MURPHY, B.D Variability in FSH-LH ratios among of commercially available gonadotrophins. **Theriogenology**, v.25, p.167, 1986. [Abstract].

LÓPEZ-GATIUS, F. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. **Theriogenology** 77, 1029–1041, 2012.

LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I. Ultrasound and endocrine findings that help to assess the risk of late embryo/early foetal loss by non-infectious cause in dairy cattle. **Reproduction Domestic Animal**. 45 (Suppl 3), 15–24, 2010.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MARTINO, A.; DELÉTANG F.; DE RENSIS, F. The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. **Theriogenology**, v 65, 820–830, 2006.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.; RUTLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, v 57, 1251–1261, 2002.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHERS W. W. Factors That Affect Ovarian Follicular Dynamics in Cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-3626, 1992.

MARTINEZ, M.F.; TUTT, D.; QUIRKE, L.D.; TATTERSFIELD, G.; JUENGEL, J.L. Development of a GnRH-PGF2 α -progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle. **Journal of Animal Science**. V.92, p.4935-4948., 2014.

MANN, G.E.; ROBINSON, R.S.; HUNTER, M.G. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. **Theriogenology**, v 67 1256-1261, 2007.

MARTINS, C.M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; SOUSA, M.G.; BARUSELLI, P.S. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae.**, v.34, p.227, 2006.

MACMILLAN, K.; KASTELIC, J.P.; COLAZO, M.G.; Update on Multiple Ovulations in Dairy Cattle. **Animals**, 2018, 8, 62.

MEE, J.F. Factors affecting the spontaneous twinning rate and the effect of twinning on calving problems in nine Irish herds. **Irish Veterinary Journal**, v.44, p.14-20, 1991.

MENEGHETTI, M. Mês de parição, condição corporal e resposta a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. 2006. 66p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2006.

Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-674, 2003

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J.L.M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.60, n.4, p.786-793, 2008.

MIHM, M. & AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 23, n.1-2, p. 155-166, 2002.

MIHM, M.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. **Biology Reproduction**, v 57:1328–1337, 1997.

MORAN, C. QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v.18, p. 167-182, 1989.

MURPHY, B.D. Equine chorionic gonadotropin: An enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n.3, p. 223-230, 2012.

MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.523-533, 1990.

NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, M.A.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipientes. **Theriogenology**, v. 62, n.9, p. 1577-1584, 2004.

NEMENYI P (1963). Distribution-free Multiple Comparisons. Ph.D. thesis, Princeton University, apud MILLER Jr., R.G., Simultaneous statistical inference, (eds.) **McGraw-Hill New York**, (2nd.ed.), 1981, p. 129-188.

OZIL, J.P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. **Journal Reproduction and Fertility**., v 69:463-468, 1983.

PERES, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 72, n. 5, p. 681-689, Sept. 2009.

RIDING, G.A.; LEHNERT, S.A.; FRENCH, A.J.; HILL, J.R. Conceptus-related measurements during the first trimester of bovine pregnancy. **Veterinary Journal** 175, 266–272, 2008.

ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTEMKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v.42, p.917-929, 1994.

ROOVER, R., GENICOT, G., LEONARD, S., BOLS, P., DESSY, F., 2005b. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**. 86, 13–25.

ROVIRA, J. Manejo da reprodução com vacas de cria. In: **JORNADA TÉCNICA DE BOVINOCULTURA DE CORTE NO RS**, 1, Bagé. Bagé, EMBRAPA. p. 157 175. 1981.

ROSE, E.P.; WILTON, J.W., Productivity and profitability of twin births in beef cattle, **Journal of Animal Science**, v.69, p.3085-3093, 1991.

ROSTAMI, B.; NIASARI-NASLAJI, A.; VOJGANI, M.; NIKJOU, D.; AMANLOU, H.; GERAMI, A. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 2011, 128, 100-106.

ROWSON, L.E.A.; LAWSON, R.A.S.; MOOR, R.M. Production of twins in cattle by egg transfer. **Journal of Reproduction Fertility**, v.25, p.261, 1971.

ROWSON, L.E.A.; MOOR, R.M.; LAWSON, R.A.S. Twinning in Cattle. **The Veterinary Record**, v.85, p.583-584, 1969.

SÁ FIHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 129, n. 3/4, p. 132-139, December 2011b.

SALES JNS, CREPALDI G A, GIROTTI RW, SOUZA A H, BARUSELLI PS. Fixedtime AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science** 2011;124:12–8.

SALES, J. N. S. et al. Embryo production and quality of Holstein heifers and

cows supplemented with beta-carotene and tocopherol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, n. 1/2, p. 77-89, June 2008.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2 ed. Belo Horizonte: **Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2002.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. 2382-2394, 2004.

SOUMANO, K.; PRICE, C. A. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 522, n. 56, p. 516-522, 1997.

SOUZA, A. H. inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. 2009. 152p. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA-DEL-RÍO, N.; COLLOTON, J.D.; FRICKE, P.M. Factors affecting pregnancy loss for single and twin pregnancies in a high-producing dairy herd. **Theriogenology**, v. 71, 1462–1471, 2009.

SIQUEIRA, L.C. Esteróides no controle da regressão de folículos de diferentes diâmetros para uso em sistemas de inseminação artificial em tempo fixo de vacas de corte no pós-parto. 2007. 77f. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

SIROIS J.; FORTUNEJ.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, n.39, p.308-317, 1998.

SUDANO, M.J, et al. Falha da ovulação após tratamento com ECG em vacas nelore (*Bos taurus indicus*). *Veterinária e Zootecnia.*, p.592-600. V.16, n.4, dez., 2009.

SUZUKI, O.; GESHI,M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M. Calf production by bilateral embryo transfer or contralateral embryo transfer to previously inseminated cows. **Animal Science**, v.67, n.8, p.732-739, 1996.

TAGAWA, M.; MATOBA, S.; NARITA, M.; SAITO, N.; NAGAI, T.; IMAI, K. Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system **Theriogenology**, v.69, p.574–582, 2008.

TESTART, J.; GODARD-SIOUR, C.; MESNIL DU BUISSON, F. Transvaginal transplantation of an extra egg to obtain twinning in cattle. **Theriogenology**, v.4, n.5, p.163-168, 1975.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; AYRES, H.; ARAÚJO, R. L.; MAGALHÃES, D. M.; SOUSA, A. H.; BARUELLI, P.S. Dinâmica folicular de vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular de norgestomet associado ao cipionato de estradiol e

submetidas a administração de GnRH 48 ou 54 horas após a retirada do implante. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1111, 2007. Resumo.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; MELO, W.O.; ELIAS, A.K.S.; RODRIGUES, L.S.; PENTEADO, L. BARUSELLI, P.S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.53-58, jan./mar. 2009.

TRIBULO, H.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; GATTI, G.; TRIBULO, R.; CACCIA, M.; BÓ, G.A. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and CG and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v.57, n1, p 563, 2002.

TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.J. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.113-119, 1993.

TURMAN, E. J., D. B. LASTER, R. E. RENBARGER, AND D. F. STEPHENS. Multiple births in beef cows treated with equine gonadotropin (PMS) and chorionic gonadotropin (HCG). **Journal of Animal Science**. Sci. 32:962–967, 1971.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L. de S. Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p. (**EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 71**).

VALLE, E. R.V.; ANDREOTTI, R.; LOPES, L.R. Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte. **Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 2000.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, p.63-74, 2004.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M, SANGSRITAVONG, S.; SARTORI, R.; GINTHER, O.J. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 83 2998-3007, 2000.

WILLMONT, N.; SAUDERS, J.; BÓ, G.A.; PALASZ, A.; MAPLETOFT, R.J. The effect of FSH/LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. **Theriogenology**, v.33, p.347, 1990. [Abstract].

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCK, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.

