

## EFICIÊNCIA DO CIPIONATO DE ESTRADIOL E DO BENZOATO DE ESTRADIOL EM PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DA OVULAÇÃO SOBRE A DINÂMICA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS NELORE INSEMINADAS EM DIFERENTES MOMENTOS

Bruno Henrique de Araújo Andrade<sup>1</sup>, Priscila Assis Ferraz<sup>1</sup>, Alexandra Soares Rodrigues<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub<sup>1</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UFBA

Correspondência: Bruno Andrade: bruno.henryque@gmail.com

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar a dinâmica ovariana e a taxa de concepção de fêmeas Nelore submetidas à IATF utilizando o benzoato ou o cipionato de estradiol como indutores da ovulação e inseminadas nos turnos da manhã ou da tarde. Para tanto, 296 animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona e a aplicação de 2,0 mg benzoato de estradiol em um dia aleatório, denominado D0. No D8 houve a remoção dos implantes, a administração de 500 µg de Cloprostenol e 300 UI de gonodotrofina coriônica equina. Neste momento, metade dos animais recebeu 1,0 mg de cipionato de estradiol, e a outra metade 1,0 mg de benzoato de estradiol no dia posterior (D9), constituindo os tratamentos CE e BE, respectivamente. No experimento 1, 38 animais (19 de cada tratamento) tiveram a dinâmica ovariana acompanhada por ultrassonografia. No experimento 2, 258 animais distribuídos nos tratamentos (CE e BE) foram estratificados para que as inseminações ocorressem pelo turno da manhã (M) ou da tarde (T) do D10, constituindo os grupos CE-M (n = 65), BE-M (n = 65), CE-T (n = 63) e BE-T (n = 65). Não foi encontrada diferença entre os tratamentos para as variáveis: diâmetro do folículo ovulatório, momento das ovulações, taxa de ovulação e diâmetro do corpo lúteo, entretanto, os animais do grupo CE apresentaram maior taxa de crescimento folicular (CE: 0,48 mm/dia; BE: 0,29 mm/dia). Não houve diferença na taxa de concepção entre os grupos CE-M (52,3%), BE-M (41,5%), CE-T (41,3%) e BE-T (49,2%). O emprego do cipionato em substituição ao benzoato proporciona uma redução no número de manejos sem comprometer a dinâmica ovariana e os índices de concepção. Adicionalmente, a extensão no intervalo para realização das inseminações revela-se como uma alternativa aos modelos de gestão no uso desta biotecnologia.

**Palavras-chave:** corpo lúteo; dinâmica folicular; IATF; ultrassonografia

## EFFICIENCY OF ESTRADIOL CYPIONATE AND ESTRADIOL BENZOATE IN OVULATION INDUCER PROTOCOLS ON OVARIAN DYNAMICS AND CONCEPTION RATE OF NELORE FEMALES INSEMINATED AT DIFFERENT TIMES

**ABSTRACT:** We aim to evaluate the ovarian dynamics and conception rates of Nelore females subjected to TAI using benzoate or estradiol cypionate as ovulation inducers and inseminated that morning or afternoon. For this, 296 animals received an intravaginal progesterone device and 2,0 mg of estradiol benzoate applied on a random stage of the oestrous cycle, named D0. On D8, the devices were removed and 500 µg of Cloprostenol and 300 IU of equine chorionic gonadotropin were administered. At that time, half of the animals received 1,0 mg of estradiol cypionate, and the other half received 1,0 mg of estradiol benzoate on the following day (D9), establishing the EC and EB treatments respectively. On experiment 1, 38 animals (19 for each treatment) had the ovarian dynamics accompanied by ultrasonography. On experiment 2, 258 animals were randomly distributed according to treatments (EC and EB) in order for the inseminations to occur in the morning (M) or in the afternoon (T) of D10, establishing thus groups EC-M (n = 65), EB-M (n = 65), EC-T (n = 63) and EB-T (n = 65). No difference was found between the treatments for the variables: diameter of ovulatory follicle, time of ovulation, ovulation rate and diameter of corpus luteum, however, the animals treated with estradiol cypionate presented a greater follicular growth rate (EC:0,48 mm/day; EB: 0,29 mm/day). On experiment 2, there was no difference in the conception rate between the groups EC-M (52,3%), EB-M (41,5%), EC-T (41,3%) and EB-T (49,2%). The employment of the estradiol cypionate in substitution to the estradiol benzoate provided a reduction in animal manipulation without compromising the conception rates. Additionally, the extension of the insemination interval seems to be an alternative for the management models using this technology.

**Key Words:** corpus luteum; follicular dynamics; FTAI; ultrasonography

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma técnica mundialmente difundida e cumpre um importante papel no aproveitamento de indivíduos de maior mérito genético, contudo, dificuldades relacionadas com a observação do cio e momento das inseminações passam a ser um limitante em grandes rebanhos (Baruselli *et al.*, 2004). Na pecuária de corte nacional, estes entraves são agravados pelas grandes extensões territoriais, número reduzido de funcionários em relação ao tamanho do rebanho e por particularidades do comportamento reprodutivo do gado zebu (Galina *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 1998).

A busca por alternativas que contornem tais empecilhos levaram ao desenvolvimento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), uma biotécnica aplicada para o controle das ovulações, de modo que as inseminações ocorram em horário pré-determinado. Com isso, as inseminações são programadas para um momento mais apropriado a técnicos e produtores, dispensando-se a maior limitação da IA convencional, a observação de estro (Torres-Júnior *et al.* 2009).

Muitos protocolos de IATF usam das propriedades da associação estrógeno/progesterona e sua capacidade em promover a regressão folicular com surgimento de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente quatro dias (Bo *et al.*, 1994; Bo *et al.*, 1995). Os folículos recrutados da nova onda de crescimento ficam com o desenvolvimento modulado pelo dispositivo intravaginal de progesterona até o momento de sua remoção, quando, então, são empregados indutores hormonais, responsáveis por sincronizarem as ovulações dos

folículos dominantes (Silcox *et al.*, 1993; Baruselli *et al.*, 2006).

O benzoato de estradiol tem sido amplamente empregado como indutor da ovulação 24h após a remoção da progesterona (Baruselli *et al.*, 2006, Crepaldi, 2009), entretanto, pesquisas avaliaram sua substituição por um análogo hormonal, denominado cipionato de estradiol, aplicado concomitante a retirada da progesterona (Marques *et al.*, 2004; Penteadó *et al.*, 2006; Ayres *et al.*, 2006). Esta alteração permite eliminar o manejo adicional para aplicação do benzoato de estradiol, tornando a execução dos protocolos de sincronização mais simplificada (Crepaldi, 2009).

Esta linha de pesquisa fundamenta-se em particularidades da atividade destes fármacos sobre o padrão de crescimento folicular e o intervalo observado entre o tratamento e as ovulações (Souza *et al.*, 2005). A utilização do benzoato de estradiol 24h após a remoção do dispositivo de progesterona induziu o pico de LH em 16h, e as ovulações em 40h após a sua administração (Hanlon *et al.*, 1997). O uso do cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo de progesterona resultou em um pico de LH e ovulações, respectivamente, 38 e 66h após (Ambrose *et al.*, 2001). Estudos conduzidos por Crepaldi *et al.* (2008) e Peralta-Torres *et al.* (2010) revelaram que a administração do cipionato de estradiol simultânea a retirada do dispositivo de progesterona promoveu a ovulação de forma sincronizada, em cerca de 72h após seu uso, resultando em um momento semelhante ao protocolo em que se empregou o benzoato de estradiol 24h após a remoção da progesterona.

Os resultados apresentados não são consenso na literatura. Reis *et al.* (2004) encontraram que o cipionato de estradiol não era eficiente em sincronizar as ovulações dos animais

tratados com progesterona. Martins *et al.* (2005) acharam semelhantes taxas e tempo para as ovulações induzidas com o benzoato de estradiol e com o cipionato de estradiol, no entanto, classificou o cipionato de estradiol como menos eficiente em sincronizá-las.

Apesar da divergência de informação quanto à capacidade de sincronia das ovulações induzidas pelo cipionato de estradiol, a inclusão destes hormônios nos protocolos de sincronização resultaram em taxas de concepção semelhantes às obtidas com o benzoato de estradiol, nas inseminações realizadas 48h (Sales *et al.*, 2008), entre 52 e 56h (Ayres *et al.*, 2006) e entre 54 e 58h (Penteado *et al.*, 2006) após a remoção da progesterona.

As expectativas pela simplificação dos protocolos de sincronização levaram alguns pesquisadores a explorarem ao máximo o intervalo para realização das inseminações. Esta estratégia viabiliza um maior número de animais submetidos a um protocolo com as inseminações concentradas em um único dia. O conhecimento do momento das ovulações foi relatado como um evento determinante sobre os resultados das inseminações (Pursley *et al.*, 1997; Roelofs *et al.* 2005; Ayres *et al.*, 2008). Roelofs *et al.* (2006), verificaram melhores taxas de concepção e embriões de melhor qualidade nas inseminações realizadas entre 12 e 24h antes da ovulação. Portanto, existe um intervalo de 12h para que as inseminações sejam realizadas, sem que haja comprometimento dos índices reprodutivos (Roelofs *et al.* 2006).

Respeitando estes intervalos para realização das inseminações, a flexibilização do momento da IA foi utilizada sem que houvesse comprometimento nos índices de concepção dos animais inseminados 48h (turno da manhã) e 54h (turno da

tarde) após a remoção do dispositivo de progesterona com a utilização do cipionato de estradiol (Andrade *et al.*, 2010) e do benzoato de estradiol (Ayres *et al.*, 2008). Todavia, alguns pesquisadores relataram uma redução na taxa de concepção quando o cipionato de estradiol foi utilizado nos protocolos de indução da ovulação e as inseminações foram realizadas no período da tarde (Castro Júnior *et al.*, 2008; Crepaldi, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a dinâmica ovariana e a taxa de concepção de fêmeas Nelore submetidas a IATF utilizando o benzoato de estradiol ou o cipionato de estradiol como indutores da ovulação e inseminadas nos turnos da manhã ou da tarde.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados durante os meses de fevereiro e março de 2011, em uma propriedade localizada no semi-árido baiano (Latitude: 13°16'49.88"S e Longitude: 40°40'51.85"O), que adotava sistema extensivo de criação em pastagem de Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Foram utilizadas 296 fêmeas Nelore com médias para idade, escore de condição corporal (escala de 1 a 5), número de partos e período pós-parto de, respectivamente: 8,22 ± 2,47 anos; 2,56 ± 0,42; 4,12 ± 2,02 partos e 110,09 ± 30,73 dias. Os animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal utilizando-se um transdutor linear de 6,0 MHz (Pie-Medical, Falco 100, Maastricht, Holanda) e verificou-se que 91% das fêmeas não apresentavam corpo lúteo.

## Experimento 1

Para avaliar a dinâmica folicular e o momento das ovulações, 38 animais foram uniformemente distribuídos segundo idade, escore de condição corporal, número de partos, período pós-parto e atividade ovariana (presença de corpo lúteo). Iniciou-se o tratamento em um estágio aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0), quando todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e aplicação intramuscular (i.m) de 2,0 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Schering Plough, São Paulo, Brasil). Os dispositivos foram removidos concomitante com a aplicação de 500 µg de Cloprostenol i.m. (Sincrocio®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) i.m. (Novormon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) oito dias após. Neste momento os animais foram divididos uniformemente em dois grupos experimentais, 19 animais foram tratados com 1,0 mg de cipionato de estradiol i.m. (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil), enquanto a outra metade (n = 19), recebeu 1,0 mg de benzoato de estradiol i.m. pela manhã do dia posterior (D9). Todas as intervenções foram iniciadas no mesmo horário, às 8:00h (Figura 1).

No dia 10 do protocolo, 48 h após a remoção do dispositivo de progesterona, foi iniciada a mensuração folicular (FOL-48) utilizando imagens de ultrassom com transdutor linear de 6,0 MHz (Pie-Medical, Falco 100, Maastricht, Holanda) a intervalo de 8h entre as avaliações, até as 20:00h do dia 12 do protocolo. Outro exame ultrassonográfico foi feito no dia 20 do protocolo para confirmação da ovulação e avaliação do diâmetro do corpo lúteo (Figura 1). As mensurações foram realizadas pelo mesmo técnico. Foi considerada ovulação o

desaparecimento do folículo ovulatório entre dois exames ultrassonográficos consecutivos, associado à presença de um corpo lúteo no exame ultrassonográfico do dia 20 do protocolo. A taxa de crescimento folicular (TX-CRE) foi obtida pela diferença entre o último diâmetro folicular antecedendo a ovulação (FOL-OV) e seu primeiro registro ao exame ultrassonográfico (FOL-48), dividido pelo tempo decorrido entre as duas observações. Os resultados da variável TX-CRE foram expressadas na unidade de milímetros por dia (mm/d).

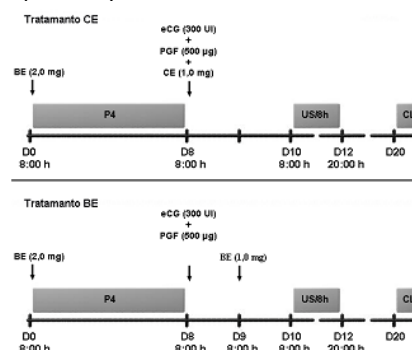


Figura 1 - Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação e da dinâmica ovariana. Tratamento CE - 1 mg de cipionato de estradiol aplicado concomitante a remoção de progesterona (D8). Tratamento BE - aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol no dia posterior (D9). Ambos tratamentos foram submetidos aos exames de ultrassonografia transretal (US) a partir do D10, realizado a cada 8 h até as 20:00 h do D12. O diâmetro do corpo lúteo (CL) foi verificado no D20 pela mesma técnica.

Os dados foram processados pelo *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19). As diferenças nas médias entre os grupos das variáveis: a) diâmetro folicular à primeira avaliação (FOL-48), b), último diâmetro registrado antecedendo a ovulação (FOL-OV) e, c) tempo entre a retirada do dispositivo de progesterona até a ovulação (OV) foram avaliadas por meio do teste *T-student*. As diferenças entre as percentagens de animais que responderam ao tratamento de indução da ovulação (TXOV) foram comparadas empregando um estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As diferenças nas médias entre os grupos para a variável diâmetro do corpo lúteo (CL) foram avaliadas por meio do teste *T-student*. Como a variável taxa de crescimento folicular (TXCRE) não apresentou distribuição normal, os grupos foram

comparados utilizando o teste Wilcoxon-Signed-Ranks. Para verificar a correlação entre as variáveis FOL-OV e OV, e das variáveis FOL-OV e CL empregou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Os testes foram realizados considerando um nível de significância de 0,05.

### Experimento 2

Para avaliação da taxa de concepção, 258 animais uniformemente distribuídos em dois tratamentos experimentais (BE: n = 130 e CE: n = 128) foram submetidos aos mesmos protocolos hormonais descritos no experimento 1. As inseminações artificiais foram realizadas por um único técnico no D10 do protocolo. Neste momento, metade dos animais tratados com cipionato de estradiol e metade dos animais tratados com benzoato de estradiol foram separados ao acaso para que as inseminações ocorressem pelo turno da manhã (M), das 8:00h às 12:00h, ou da tarde (T), das 14:00h às 18:00h, constituindo assim os grupos CE-M, administração de cipionato de estradiol no D8 e inseminação pela manhã do D10 (n = 65), BE-M, administração de benzoato de estradiol no D9 e inseminação pela manhã do D10 (n = 65), CE-T, administração de cipionato de estradiol no D8 e inseminação pela tarde do D10 (n = 63) e BE-T, administração de benzoato de estradiol no D9 e inseminação pela tarde do D10 (n = 65) (Figura 2). Para as inseminações empregou-se sêmen criopreservado comercializado de um único touro da raça Nelore. Os parâmetros espermáticos dessas doses de sêmen se enquadraram aos valores mínimos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry e Neves, 1998). No momento da IA, o sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal,

55 dias após as inseminações, utilizando transdutor linear de 6,0 MHz (Pie-Medical, Falco 100, Maastricht, Holanda). Foi considerado diagnóstico de gestação positivo a presença de um feto visível com viabilidade confirmada (batimento cardíaco). A taxa de concepção foi calculada dividindo o total de vacas gestantes pelo total de vacas inseminadas.

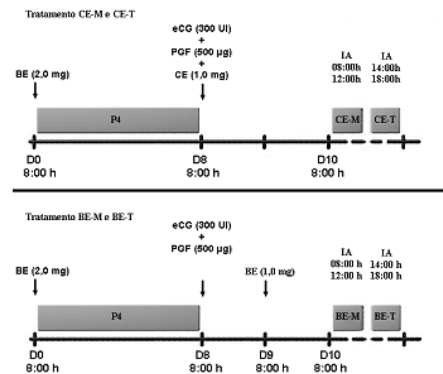


Figura 2 - Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação e do momento das inseminações. Tratamento CE-M: aplicação de 1,0 mg de cipionato de estradiol concomitante a retirada do implante de progesterona e inseminações realizadas nos turnos da manhã. Tratamento CE-T: aplicação de 1,0 mg de cipionato de estradiol concomitante a retirada do implante de progesterona e inseminações realizadas no turno da tarde. Tratamento BE-M: aplicação de 1,0 mg de benzoato de estradiol 24 horas após a remoção do implante de progesterona (D9) e inseminações realizadas no turno da manhã. Tratamento BE-T: aplicação de 1,0 mg de benzoato de estradiol 24 horas após a remoção do implante de progesterona (D9) e inseminações realizadas no turno da tarde.

O experimento foi realizado atendendo os padrões de amostragem e graus de liberdade estabelecidos por Sampaio (2002). A taxa de concepção entre os grupos CE-M, BE-M, CE-T e BE-T foram comparadas empregando um estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), disponível no pacote estatístico SPSS (versão 19), considerando nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1

#### Diâmetro folicular

Dois animais do Grupo BE não responderam ao tratamento de sincronização da ovulação, pois não foi verificada presença de folículo ovulatório e corpo lúteo nestes animais, respectivamente, dois dias e 12 dias após a retirada do dispositivo de progesterona. Sendo assim, os valores do diâmetro folicular, momento da

ovulação e diâmetro do corpo lúteo destes animais não foram considerados para as análises estatísticas.

O diâmetro médio dos folículos ao início das observações, 48h após a retirada da progesterona, não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1). Foi observado que os folículos continuaram seu crescimento até 56h, estabilizando-se deste momento até as 64h, quando apresentavam média de  $12,76 \pm 1,86$  mm (CE:  $13,03 \pm 2,24$  mm e BE:  $12,47 \pm 1,34$  mm) (Figura 3). Resultados semelhantes foram descritos por Peralta-Torres *et al.* (2010), ao encontrarem que o diâmetro máximo dos folículos foram atingidos 48h após a remoção da progesterona, estabilizando em cerca de 11 a 12mm até o momento das ovulações.

Tabela 1 - Média e desvio padrão (SD) das variáveis: FOL-48, FOL-OV, OV, TXOV, CL e TXCRE (n=38).

	CE <sup>1</sup>	BE <sup>2</sup>	Valor de P
	Média $\pm$ (SD)	Média $\pm$ (SD)	
FOL-48 <sup>1</sup> (mm)	11,86 $\pm$ 2,57	11,84 $\pm$ 1,59	0,977
FOL-OV <sup>2</sup> (mm)	13,31 $\pm$ 2,25	12,69 $\pm$ 1,21	0,303
OV <sup>3</sup> (h)	73,74 $\pm$ 5,75	74,76 $\pm$ 7,30	0,642
TXOV <sup>4</sup> (%)	100,00	89,50	0,146
CL <sup>5</sup> (mm)	16,96 $\pm$ 3,74	17,42 $\pm$ 2,98	0,689
TXCRE <sup>6</sup> (mm/d)	0,48 $\pm$ 0,49 <sup>7</sup>	0,29 $\pm$ 0,28 <sup>8</sup>	0,000

<sup>1</sup>FOL-48: diâmetro do folículo 48 h após a remoção do dispositivo de progesterona

<sup>2</sup>FOL-OV: diâmetro do folículo ovulatório

<sup>3</sup>OV: momento das ovulações

<sup>4</sup>TXOV: taxa de ovulação

<sup>5</sup>CL: diâmetro do corpo lúteo

<sup>6</sup>TXCRE: taxa de crescimento folicular

<sup>7</sup>CE: grupo tratado com cipionato de estradiol aplicado simultânea a remoção da progesterona

<sup>8</sup>BE: grupo tratado com benzoato de estradiol aplicado 24 h após a remoção da progesterona

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam valores diferentes (P<0,05).

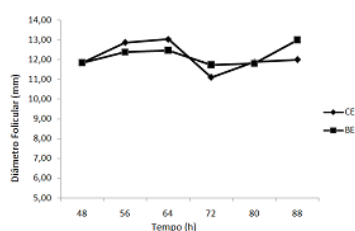


Figura 3 - Acompanhamento do diâmetro folicular a partir das 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona para os animais tratados com cipionato de estradiol (CE) ou com benzoato de estradiol (BE).

A utilização de estratégias buscando aumentar o diâmetro do folículo ovulatório são alternativas para melhorar a eficiência dos protocolos de sincronização. Nos trabalhos de Vasconcelos *et al.* (2001) e Ferraz *et al.* (2010), os autores relacionaram

folículos com maiores diâmetros ovulatórios a índices de concepção superiores. Sendo assim, a utilização de indutores que resultem em folículos de maior tamanho poderiam incrementar os resultados dos protocolos de sincronização.

Na comparação entre os tratamentos CE e BE foi verificado que o emprego do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol resultaram em folículos com diâmetros ovulatórios semelhantes (Tabela 1). Crepaldi (2009) também relatou não haver diferenças sobre o diâmetro médio dos folículos ovulatórios para os animais que receberam cipionato de estradiol no dia 8 ( $14,0 \pm 0,6$  mm), e o benzoato de estradiol ( $13,6 \pm 0,5$  mm) no dia 9 do protocolo. Da mesma forma, Reis *et al.* (2004), ao trabalharem com aplicações do benzoato de estradiol e do cipionato de estradiol em ambos os dias, 8 e 9 do protocolo, observaram um menor diâmetro folicular apenas nos animais cuja administração do benzoato de estradiol ocorreu simultânea a remoção do progestágeno (dia 8).

### Ovulações

O intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e as ovulações foi similar entre os dois tratamentos (Tabela 1). Os resultados assemelham-se aos obtidos por Crepaldi *et al.* (2008) (cipionato de estradiol:  $72,0 \pm 2,0$ h, benzoato de estradiol:  $72,0 \pm 0,0$ h), e Sales *et al.* (2008) (cipionato de estradiol: 74,5h, benzoato de estradiol: 76,1h), os quais observaram não haver diferença entre a utilização destes indutores e o momento em que as ovulações ocorriam. Peralta-Torres *et al.* (2010) sugeriram que ambos indutores foram igualmente eficientes em promover o aumento da frequência dos pulsos de LH e sincronizar as ovulações dos animais tratados com cipionato de estradiol ( $70,0 \pm 7,7$ h) e com o benzoato de estradiol ( $73,0 \pm 6,5$ h), sobretudo, foi evidente

uma tendência na antecipação deste evento em cerca de 15h, em relação ao grupo controle, no qual não empregaram algum indutor ( $88,0 \pm 22,3h$ ).

Todavia, alguns estudos apontaram que a utilização do cipionato de estradiol resultava em atraso nas ovulações, as quais surgiam de forma não sincronizada (Reis *et al.*, 2004) ou menos sincronizada (Martins *et al.*, 2005) do que o obtido com a utilização do benzoato de estradiol. Paradoxalmente, quando Crepaldi (2009) utilizou dispositivos de progesterona reutilizados, propôs que a menor disponibilidade de progesterona nestes dispositivos estaria favorecendo a antecipação das ovulações, prejudicando desta forma, os índices de concepção apenas nos animais em que foi empregado o cipionato de estradiol. Entretanto, no presente experimento este mecanismo não foi observado, podendo ser justificado por ter sido utilizado apenas dispositivos novos de progesterona nos protocolos.

#### **Taxa de Ovulação**

A taxa de ovulação (TXOV) não diferiu entre os tratamentos CE e BE (Tabela 1), corroborando com resultados de outros pesquisadores (Reis *et al.*, 2004, Martins *et al.*, 2005, Crepaldi, 2009, Peralta-Torres *et al.*, 2010). Dois animais do tratamento BE não ovularam e um deles, embora tenha apresentado um folículo de 11,5 mm de diâmetro, este folículo começou a entrar em atresia a partir do dia 11 do protocolo, provavelmente, por não ter alcançado capacidade ovulatória. Sartori *et al.* (2001), ao trabalharem com vacas holandesas (*Bos taurus taurus*), observaram que os folículos começavam a adquirir capacidade ovulatória a partir de 8,5mm de diâmetro, ainda assim, apenas 80% dos folículos com mais de 10mm foram eficientes em responder ao tratamento

de indução da ovulação; da mesma forma, Gimenes *et al.* (2008), ao induzirem a ovulação em fêmeas Nelore, constataram que 10% dos folículos com mais de 10mm não responderam a aplicação do LH. Portanto, nem todos os folículos que ultrapassam 10mm de diâmetro alcançam a capacidade ovulatória. Além disso, fatores relacionados à sensibilidade individual à progesterona liberadas pelos dispositivos, podem interferir sobre os resultados de ovulação, por exercer feedback negativo ao aumento da frequência dos pulsos de LH (Roberson *et al.*, 1989; Carvalho *et al.*, 2008; Cipriano *et al.*, 2011). O outro animal que não respondeu ao tratamento de indução da ovulação apresentou folículo de 6mm de diâmetro, permanecendo estático durante as observações. A ausência de crescimento observada neste folículo pode ser explicada pelo fato destas estruturas apresentarem uma escassez de receptores de LH como apontado por Nogueira *et al.* (2005) e Gimenes *et al.* (2008).

A distribuição das ovulações mostrou-se bastante uniforme entre os animais que receberam cipionato de estradiol e benzoato de estradiol: apenas 7,14% (1/19) dos animais de cada tratamento ovularam no intervalo até 64h, 7,14% (n = 1/19) ovularam após as 80h e 31,58% (6/19) no intervalo 72-80h. A única diferença numérica verificada ocorreu no intervalo 64-72h, quando 57,89% (11/19) dos animais que receberam cipionato de estradiol ovularam, contra 47,37% (9/19) dos animais que receberam benzoato de estradiol.

#### **Corpo lúteo**

Os diâmetros dos corpos lúteos não diferiram entre os tratamentos (Tabela 1). Segundo Viana *et al.* (1999) o diâmetro máximo do corpo lúteo é alcançado entre os dias 7 e 16 do ciclo

(9,64 ± 0,25 dias). O diâmetro médio dos corpos lúteos apresentado por estes autores em vacas Gir, compararam-se ao deste experimento e aos encontrados por Figueiredo *et al.* (1997) em vacas Nelore (15,90 a 17,69mm). Baruselli *et al.* (2003) e Vasconcelos *et al.* (2001) verificaram que corpos lúteos com maior área determinaram maiores taxas de concepção, atribuindo tal relação à sua maior capacidade de produção de progesterona. Neste aspecto, ambos indutores resultaram em corpos lúteos de diâmetro similar, corroborando com os achados de Reis *et al.* (2004), os quais verificaram não haver diferença entre as áreas dos corpos lúteos com a utilização do cipionato de estradiol (3,23 ± 0,24cm<sup>2</sup>) aplicado concomitante a remoção da progesterona, ou da aplicação do benzoato de estradiol (3,04 ± 0,27cm<sup>2</sup>) realizada 24h depois.

#### **Taxa de Crescimento Folicular**

As taxas de crescimento observadas para ambos os tratamentos (Tabela 1) foram inferiores à média reportada anteriormente para *Bos taurus indicus*, de 0,9mm/dia (Castilho *et al.*, 2007; Gimenes *et al.*, 2008). Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato dos valores iniciais do diâmetro folicular terem sido aferidos 48h após a remoção da fonte de progesterona, desconsiderando assim, o crescimento que houve desde o início de desenvolvimento da onda.

A taxa de crescimento do folículo ovulatório dos animais tratados com cipionato de estradiol foi significativamente superior àquela observada para os animais do tratamento BE (Tabela 1), demonstrando que os folículos das fêmeas tratadas com cipionato de estradiol, como indutor da ovulação, apresentaram uma maior habilidade de crescimento.

Considerando o estradiol-17β como a molécula cuja função biológica esta envolvida na habilidade dos

folículos em adquirirem receptores de LH e no crescimento folicular (Stewart *et al.*, 1995), alguns estudos buscaram definir diferentes perfis em sua disponibilidade após o emprego dos ésteres, cipionato de estradiol e benzoato de estradiol. Souza *et al.* (2005) caracterizaram a circulação do estradiol-17β de animais submetidos à aplicação de 1,0mg destes fármacos e observaram que as concentrações de estradiol-17β tendiam a aumentar 24h após a administração do cipionato de estradiol, e um aumento significativo foi verificado 4h após a administração do benzoato de estradiol. Estes resultados indicam que o emprego do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol, quando utilizados em momentos distintos do protocolo (D8 e D9, respectivamente), deve resultar em folículos submetidos a maiores quantidades de estradiol-17β em um momento comum - cerca de 28h após a remoção da progesterona.

Vynckier *et al.* (1990) administraram 10,0mg de cipionato e 2,0mg de benzoato de estradiol e chegaram as seguintes observações: o cipionato de estradiol disponibilizava um menor pico de estradiol-17β (cipionato de estradiol: 56-128pg/mL e benzoato de estradiol: 222-320pg/ mL), que surgia mais tardiamente (cipionato de estradiol: 13-31h e benzoato de estradiol: 1-23h), mas que persistia por um maior intervalo até retornarem aos níveis basais. Burke *et al.* (2000) utilizaram 1,0mg do benzoato de estradiol e observaram concentrações elevadas do estradiol-17β 4h após o tratamento, os quais mantinham-se elevadas (12,0pg/mL) por um período de 24h. Perry e Perry (2008) e Amer (2008), por sua vez, ao trabalharem com a mesma dosagem utilizando o cipionato de estradiol, observaram que as maiores concentrações do estradiol-17β eram atingidas 24h após o tratamento. Considerando estas diferenças, é



possível que níveis de estradiol-17 $\beta$  passem a agir mais precocemente sobre a dinâmica folicular dos animais tratados com cipionato de estradiol, principalmente, níveis que antecedendo seu pico de concentração, estejam a contribuir para uma maior taxa de crescimento destes folículos.

### Correlações

A partir das 64h, o diâmetro médio dos folículos foi representado graficamente por uma tênue diminuição para os animais do tratamento CE (Figura 3). Esta observação pode estar relacionada ao achado de Gimenes *et al.* (2008), de que quanto maior o tamanho do folículo, menor é o tempo para que estes folículos ovulem. Tal consideração foi confirmada para os animais do tratamento CE, onde verificou-se uma correlação moderada e negativa entre o diâmetro do folículo ovulatório e o momento da ovulação ( $R = -0,480$ ;  $P = 0,038$ ). No entanto, esta associação não ocorreu para os animais tratados com benzoato de estradiol ( $R = -0,204$ ;  $P = 0,431$ ).

O diâmetro do folículo ovulatório mostrou-se positiva e moderadamente correlacionada com o diâmetro do CL ( $R = 0,416$ ;  $P = 0,012$ ). Relacionado a estas variáveis, Baruselli *et al.* (2003) verificaram que corpos lúteos com maior área determinaram maiores concentrações de progesterona e taxas de concepção. Vasconcelos *et al.* (2001) observaram que folículos menores estavam relacionados a corpos lúteos de menor diâmetro e a baixa fertilidade, atribuindo estes achados à menor capacidade dos corpos lúteos em produzir progesterona. Esta argumentação é controversa aos achados de Robinson *et al.* (2005), os quais não confirmaram tal correlação, contudo, folículos maiores estiveram relacionados a uma maior produção de estrógenos no período pré-ovulatório e a expressão mais precoce de

progesterona. Estes autores concluíram que o desenvolvimento embrionário e sua manutenção durante os estágios iniciais da gestação estão mais relacionados ao diâmetro do folículo ovulatório, do que propriamente ao diâmetro do corpo lúteo.

### Experimento 2

A taxa de concepção média foi de 46,1% e não houve diferença entre os grupos experimentais CE-M, BE-M, CE-T e BE-T (Tabela 2). Meneghetti *et al.* (2009) também não verificaram diferenças na taxa de concepção entre os animais que receberam cipionato de estradiol concomitante a remoção do dispositivo de progesterona ou o benzoato de estradiol aplicado 24h depois, quando as inseminações foram realizadas no turno da manhã (cipionato de estradiol: 56,7% e benzoato de estradiol: 57,1%). Da mesma forma, Ayres *et al.* (2006) e Penteado *et al.* (2006) não encontraram diferenças entre os animais tratados com estes indutores e inseminados, respectivamente, nos intervalos 52 - 56h e 54 - 58h após a remoção da progesterona.

Tabela 2 - Taxa de concepção dos animais submetidos aos protocolos de sincronização da ovulação com cipionato de estradiol ou benzoato de estradiol e inseminados em diferentes turnos (Manhã e Tarde).

	Grupos	
	Experimentais	Nº
CE-M <sup>1</sup>	52,3%	(34/65)
CE-T <sup>2</sup>	41,3%	(26/63)
BE-M <sup>3</sup>	41,5%	(27/65)
BE-T <sup>4</sup>	49,2%	(32/65)
valor de P	0,494	---

<sup>1</sup>CE-M - grupo tratado com cipionato de estradiol no D8 e inseminado pela manhã do D10

<sup>2</sup>CE-T - grupo tratado com cipionato de estradiol no D8 e inseminado pela tarde do D10

<sup>3</sup>BE-M - grupo tratado com benzoato de estradiol no D9 e inseminado pela manhã do D10

<sup>4</sup>BE-T - grupo tratado com benzoato de estradiol no D9 e inseminado pela tarde do D10

Estes resultados confirmam a possibilidade da realização das inseminações em diferentes turnos (manhã e tarde) sem que haja comprometimento nos índices de concepção, tornando possível a flexibilização do momento das inseminações e a inclusão de um maior número de animais no protocolo. Além

disso, os resultados encontrados nesta pesquisa e os reportados por diversos pesquisadores demonstram que a utilização do cipionato de estradiol proporciona uma redução no número de manejos e aumenta a praticidade dos programas de IATF, sobretudo em grandes rebanhos (Ayres *et al.* 2006; Castro-Júnior *et al.* 2008; Crepaldi, 2009).

Todavia, Castro Júnior *et al.* (2008), ao trabalharem com dispositivos previamente utilizados por nove dias, observaram que animais tratados com cipionato de estradiol quando inseminados à tarde apresentavam comprometimento nos índices de prenhez (cipionato de estradiol: 38,5% e benzoato de estradiol: 60,4%), sendo o mesmo não observado entre os animais inseminados no turno da manhã (cipionato de estradiol: 49,5% e benzoato de estradiol: 54,4%). Crepaldi (2009) relatou uma situação semelhante ao avaliar a taxa de concepção entre animais que receberam dispositivos novos ou previamente utilizados. Em seu estudo, animais que receberam o cipionato de estradiol e foram inseminados à tarde tiveram seus índices comprometidos apenas quando trabalhou-se com dispositivos previamente utilizados. As diferenças apresentadas por estes autores podem estar relacionadas ao número de usos do dispositivo - a menor disponibilidade de progesterona liberada por estes dispositivos estaria predispondo um aumento na pulsatilidade do LH (Carvalho *et al.* 2008), antecipando as ovulações. Desta forma, quando as inseminações são realizadas pela tarde, o tempo decorrido para as ovulações fica reduzido, interferindo nos resultados de concepção. Contudo este mecanismo não foi verificado nesta pesquisa, pois não houve o emprego de dispositivos de progesterona reutilizados.

## CONCLUSÃO

O emprego do cipionato de estradiol ou do benzoato de estradiol como indutores da ovulação mostrou eficiência semelhante em relação à dinâmica folicular. A utilização do cipionato de estradiol em substituição ao benzoato de estradiol não comprometeu os índices de concepção dos animais inseminados 48h (manhã) ou 54h (tarde) após a remoção da progesterona, no entanto, sua escolha torna a execução dos protocolos mais simplificada, proporcionando uma redução no número de manejo do protocolo e conseqüentemente um menor custo logístico e operacional. Adicionalmente, a extensão no intervalo para realização das inseminações (manhã e tarde), revela-se como uma alternativa aos modelos de gestão no uso desta biotecnologia, permitindo a inclusão de um maior número de animais submetidos a um protocolo e inseminados no mesmo dia.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudo indispensável para realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AMBROSE, D.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; KASTELIC, J.P. *et al.* Synchronization of ovulation and conception rates in Holstein heifers given an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR), and estradiol cypionate, porcine LH or gonadotropin releasing hormone. **Archiv Tierzucht**, v.44, p.77-79, 2001.
- AMER, H.A. Oestrus synchronization in high lactating dairy cows. **Mljekarstvo**, v.58, n.1, p.33-46, 2008.

- ANDRADE, B. H. A.; FERRAZ, P. A.; LOIOLA, M. V. G.; *et al.* Effect of artificial insemination moment on conception rate in a protocol for FTAI. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.2, p.359, 2010.
- AYRES, H.; MARTINS, C.M.; FERREIRA, R.M. *et al.* Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1, p.77-87, 2008.
- AYRES, H.; PENTEADO, L.; TORRES JÚNIOR, J.R.S. *et al.* Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.410, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; AYRES, H.; SOUZA, A.H. *et al.* Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, II., 2006, Londrina. **Anais...** São Paulo: VRA-FMVZ, 2006. p.103-136.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T. *et al.* Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, suppl.2, p.96-106, 2003.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. *et al.* The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.
- BO, G.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M. *et al.* The use of estradiol-17b and progesterone treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. **Theriogenology**, v.40, p.165, 1994.
- BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. *et al.* Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.31-40, 1995.
- BURKE, C.R. *et al.* Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v.78, n.1, p.145-151, 2000.
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L. *et al.* Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-75, 2008.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A. *et al.* Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, n.3-4, p.189-196, 2007.
- CASTRO JÚNIOR, J.D.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. *et al.* Efeito do tratamento com diferentes indutores da ovulação (cipionato e benzoato de estradiol) e do momento da inseminação artificial (48 e 54h após a retirada do implante de norgestomet) na taxa de prenhez de vacas nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.617, 2008.
- CIPRIANO, R.S.; CARVALHO, B.A.; MARANGONI, N.R. *et al.* LH and FSH concentration and follicular development in Nelore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, v.27, n.1, p.16-22, 2011.
- CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. São Paulo. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo.
- CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.W. *et al.* Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas nelore tratadas com cipionato ou benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.464, 2008.
- FERRAZ, P. A.; RODRIGUES, A. S.; LOIOLA, M. V. G.; *et al.* Diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.2, p.81, 2010.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. *et al.* Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, n.8, p.1489-1505, 1997.
- GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1-4, p.465-470, 1996.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T. *et al.* Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.852-858, 2008.

- HANLON, D.W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J. *et al.* Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.47, n.5, p.963-75, 1997.
- HENRY M, NEVES JP. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.
- MARQUES, M. O.; AYRES, H.; REIS, E. L.; *et al.* Efeito do cipionato e do benzoato de estradiol na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.222, 2004.
- MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; SÁ FILHO, M.F. *et al.* Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.285, 2005.
- MENEGHETTI, M.; SA FILHO, O.G.; PERES, R.F. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.179-89, 2009.
- NOGUEIRA, M.F.G.; PINTO, M.G.L.; RAINHO, C. A. *et al.* Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.337, 2005.
- PENTEADO, L.; AYRES, H.; TORRES JÚNIOR, J.R.S. *et al.* Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.401, 2006.
- PERALTA-TORRES, J.; LOPEZ, J.A.; CASTRO, F.C. *et al.* Comparison of estradiol cypionate and estradiol benzoate effects on ovarian activity, estrus and ovulation on anestrus *Bos indicus* cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.3, p.466-470, 2010.
- PERRY, G.A.; PERRY, B.L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, n.3, p.333-338, 2008.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A. *et al.* Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F<sub>2α</sub> or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.667-681, 1998.
- PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, *et al.* Pregnancy Rates Per Artificial Insemination for Cows and Heifers or Inseminated at a Synchronized Ovulation or Synchronized Estrus. **Journal of dairy science**, v.80, n.2, p.295-300, 1997.
- REIS, E.L.; GIMENES, L.U.; MARQUES, M.O. *et al.* Efeitos do cipionato e do benzoato de estradiol na dinâmica folicular e luteínica de vacas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.236, 2004.
- ROBERSON, M.S.; WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T. *et al.* Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v.41, n.6, p.997-1003, 1989.
- ROBINSON, R.S.; HAMMOND, A.J.; HUNTER, M.G. *et al.* The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, n.3, p.285-295, 2005.
- ROELOFS, J.B.; GRAAT, E.A.M.; MULLAART, E. *et al.* Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2173-2181, 2006.
- ROELOFS, J.B.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; *et al.* Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v.63, n.5, p.1366-1377, 2005.
- SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P. *et al.* Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas nelore tratadas com diferentes fontes de cipionato ou de benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.486, 2008.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P. *et al.* Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, n.5, p.1403-1409, 2001.
- SILCOX, R.; POWELL, K.; KISER, T. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **Journal of Animal Science**, v.71, suppl.1, p.219, 1993.
- SOUZA, A.H.; CUNHA, A.P.; CARAVIELLO, D.Z. *et al.* Profiles of circulating estradiol-17β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.4, p.224-232, 2005.

STEWART, R.E.; SPICER, L.J.; HAMILTON, T.D. *et al.* Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v.73, n.12, p.3719-3731, 1995.

TORRES-JÚNIOR, J.; MELO, W.; ELIAS, *et al.* Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.1, p.53-58, 2009.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N. *et al.* Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307-314, 2001.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.251-256, 1999.

VYNCKIER, L. *et al.* Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate--a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.13, n.1, p.36-42, 1990.