GUSTAVO MARTINS GOMES DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO À IATF E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÃO ENTRE VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

Londrina
2013

GUSTAVO MARTINS GOMES DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO À IATF E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÃO ENTRE VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2013

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237c Santos, Gustavo Martins Gomes dos.

Comparação da taxa de concepção à IATF e produção *in vitro* de embrião entre vacas Nelore com alta, intermediária e baixa contagem de folículos antrais / Gustavo Martins Gomes dos Santos. – Londrina, 2013.

81 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos antrais – Teses. 3. Bovino – Embrião – Teses. 4. Oócitos – Teses. 5. Nelore (Zebu) – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

GUSTAVO MARTINS GOMES DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO À IATF E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÃO DE VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL – Londrina – PR

_____
Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins
UEL – Londrina – PR

_____
Dr. Vilceu Bordignon
Universidade McGill – Montréal – CA

_____
Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza
UEMS – Aquidauana – MS

_____
Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
UNOPAR – Londrina – PR

Londrina, 09 de Setembro de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Marlene, pela educação, carinho e amor proporcionados durante toda minha vida, sempre apoiaram minhas decisões e permitiram que eu chegasse até aqui.

À minha amiga, companheira, amor da minha vida e esposa, Katia, que sempre esteve ao meu lado e que me proporcionou muitos momentos de alegria e me fez apreender muito com todas as dificuldades superadas nestes anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que esclarece e soluciona todos os problemas. Obrigado por permitir alcançar todos os meus sonhos e objetivos e, mais uma vez, conseguir alcançar mais um degrau de minha missão.

Agradeço ao Professor Marcelo, por ter acreditado em mim e me acolhido junto ao grupo, que na verdade é uma grande família. Fico feliz por, de alguma forma, ter contribuido para o início deste grande e forte grupo. Agradeço pelas orientações profissionais e principalmente pessoais durante todo este período e acima de tudo pela amizade construída. O senhor sempre será um exemplo para mim.

Agradeço aos membros da banca de qualificação (Dra. Lívia Lisboa, Profa. Dra. Maria Isabel e Prof. Dr. Thales Barreiros) pelas importantes contribuições para este trabalho. E aos membros da banca de defesa (Prof. Dr. Vilceu Bordignon, Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins, Profa. Dra. Fabiana Andrade Melo Sterza e Prof. Dr. Thales Barreiros) por aceitarem participar deste momento importante de minha carreira e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

Aos colegas do grupo do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), Lívia, Marilu, Roberta, Thiago, Fábio, Jeferson, Reginaldo, Camila Rosa, Camila Bizarro, Polyana, Paulinha, Luciana, Bruno, Alethéia, Eleni, Suellen, Fernanda, Anne, Dennys e Fabiana, que acompanharam e ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho. Vocês fazem parte desta história.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho, bem como ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UEL, pela preocupação com os alunos e estímulo a nossa formação profissional. À Helenice, secretária da pós, que sempre nos orienta e ajuda com os processos e atividades do programa.

Agradeço aos meus amigos do Grupo Nutrimental por cederem as fazendas para que pudessemos conduzir estes trabalhos. Muito Obrigado Dr. Celso por ter acreditado em nossa proposta e nos dado todo o apoio necessário para chegarmos até aqui. Obrigado a toda equipe da fazenda, Carlinho, Mandioca, Sidnei, Dinho, aos estagiários e amigos de profissão Danilo, Alan, Douglas, Afonso, Rui e à Bia que sempre nos recebeu em sua casa com muito amor e carinho e servia

sempre aqueles banquetes maravilhosos. Nada teria acontecido se não fosse a ajuda de vocês.

Agradeço aos meus amigos e colegas de profissão (Ale, Romerson, Gilmar, Tonel, Piero, Luiz, Marcelo, Lu, Naka, Rebeca, Cintia, Luciana, Poplíteo,... entre outros tantos) que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

Agradeço a toda equipe da In Vitro Brasil, por sempre ter nos dado suporte em nossos experimentos.

Aos amigos Fábio e Elis, este casal que é tão querido e que sempre nos ajudaram tanto em todos nossos trabalhos. Devemos muito a vocês.

Agradeço aos meus sogros, Carlos e Neusa, pelo apoio e carinho. Obrigado dona Neusa por sempre torcer e dar forças para que conseguissemos conquistar nossos objetivos.

À Luiza, minha mãe de coração, que sempre cuidou de mim, me deu muito carinho e torceu muito.

Ao meu irmão, que sempre me ajudou muito em tudo e pelo companheiro e parceiro que foi em todos os momentos.

Ao meu pai, Carlos, pelo exemplo de pai e homem, meu exemplo de vida, determinação, caráter e competência. E à minha mãe, Marlene, exemplo de dedicação aos filhos e marido e pela fé em Deus. Obrigado pela dedicação e por toda a educação que me deram, isso contribuiu muito para que eu chegasse até aqui, realizando mais um de meus sonhos. Amo vocês!

E por último, gostaria de agradecer a Deus mais uma vez, por ter conhecido a Katia. Nestes 10 anos juntos, passamos por muitas alegrias e dificuldades, mas sempre juntos, isso nos fez crescer e nos amar ainda mais. Obrigado por acreditar em mim e por me dar todo suporte nesta nova fase de nossas vidas. Sei que juntos vamos trilhar caminhos e alcançar objetivos muito maiores do que podemos sonhar. Te amo mais que ontem, mas, com certeza, menos do que amanhã!

Obrigado

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.
Arthur Schopenhauer

“Tentar não significa conseguir, mas certamente quem conseguiu tentou”.
Aristóteles

“Recomeça se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcances não descanses, de nenhum fruto queiras só metade”.
Miguel Torga

SANTOS, Gustavo Martins Gomes dos. **Comparação da taxa de concepção à IATF e produção *in vitro* de embrião de vacas Nelore com alta, intermediária e baixa contagem de folículos antrais.** 2013. 81 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar as taxas de concepção à IATF e a produção *in vitro* de embriões entre vacas Nelore com alta, intermediária e baixa contagem de folículos antrais (CFA). No primeiro experimento, vacas de corte Nelore (*Bos indicus,* n = 701), multíparas, paridas (40-60 dias de pós-parto) e com escore de condição corporal (ECC) de 3,0 ± 0,5 (escala 1-5) foram submetidas a protocolo de sincronização da ovulação. Em dias aleatórios do ciclo estral (D0), as vacas receberam dispositivo intravaginal (CIDR®, Pfizer, Brasil) e 2mg BE (Estrogin®, Farmavet, Brasil), IM. Na retirada do implante (D8), receberam 0,51mg PGF2α (Ciosin®, Intervet-Schering Plough, Brasil), 300UI eCG (Novormon®, Syntex SA, Argentina) e 1mg CE (ECP®, Pfizer, Brasil), IM. As vacas foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 48h após a retirada do dispositivo de P4. Folículos antrais ≥ 3 mm foram contados por ultrassonografia, utilizando transdutor intravaginal microconvexo (D0) e as vacas foram divididas em grupos de alta CFA (G-Alta, ≥25 folículos, n = 149), intermediária CFA (G-Intermediária, 11-24 folículos, n = 400) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤10 folículos, n = 152). O número de folículos foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis e as taxas de concepção foram comparadas por Qui-quadrado (p ≤ 0,05). O número médio de folículos antrais (média ± DP) foi 17,93 ± 8,45 e a taxa de concepção média 51,49% (361/701). A população folicular média foi 30,70 ± 5,66 (G-Alta), 17,03 ± 3,28 (G-Intermediária) e 7,83 ± 2,42 folículos (G-Baixa, p<0,05). Não houve diferença na taxa de concepção entre os grupos de alta e baixa CFA (51,67 vs. 60,50%), porém, a taxa de concepção do grupo de baixa CFA foi maior comparado ao grupo de intermediária CFA (60,50 vs. 48,00%, p<0,05). Dessa forma, conclui-se que vacas Nelore com baixa CFA apresentaram taxa de concepção à IATF superior comparado a vacas com intermediária CFA. No segundo experimento, comparamos a produção de embriões entre fêmeas bovinas com alta, média e baixa quantidade de oócitos obtidos por OPU. Fêmeas Nelore (*Bos indicus*, n = 66, 72-96 m) foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia com transdutor intravaginal microconvexo (7,5 MHz). Imediatamente após a recuperação, os COCs foram classificados e transportados até o laboratório para a PIVE. A FIV foi realizada com sêmen convencional de um único touro previamente testado. As fêmeas foram divididas em grupos, conforme a produção de oócitos totais: G-Alta (n = 22, ≥40 oócitos), G-Intermediário (n = 25, 18-25 oócitos) e G-Baixa (n = 19, ≤7 oócitos). Os dados foram avaliados pelo teste de Qui-Quadrado (p≤0,05). O número médio de COCs recuperados foi 50,4±11,3 (G-Alta), 21,4±3,0 (G-Intermediário) e 5,3±1,5 (G-Baixa, P<0,05). O número médio de oócitos viáveis foi 40,4±10,6 (G-Alta), 14,8± 3,0 (G-Intermediário) e 3,8±1,1 (G-Baixa, P<0,05) e a porcentagem de oócitos viáveis foi 80% (888/1109, G-Alta), 69% (371/534, G-Intermediário) e 71% (72/101, G-Baixa, p<0,05). A taxa de clivagem foi 79% (762/965, G-Alta), 74% (348/472, G-Intermediário) e 71% (65/92, G-Baixa, p<0,05) e a taxa de blastocisto foi 42% (405/965, G-Alta), 32% (153/472, G-Intermediário) e 13% (12/92, G-Baixa, P<0,05). O número médio de embriões viáveis foi 18,4±6,7 (G-Alta), 6,1±3,6 (G-

Intermediário) e 0,6±0,7 (G-Baixa, p<0,05) e a porcentagem de embriões vitrificáveis foi 81% (329/405, G-Alta), 77% (118/153, G-Intermediário) e 58% (7/12, G-Baixa, p<0,05). Conclui-se que vacas Nelore com alta produção de oócitos apresentaram ~10 vezes maior produção de oócitos e produziram ~30 vezes mais embriões viáveis em relação às de baixa. Dessa maneira, a CFA não influenciou a taxa de concepção à IATF entre vacas de alta e baixa CFA, porém, influenciou positivamente, a produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: Folículos antrais. Taxa de concepção. Oócitos. Embriões. Bovinos.

SANTOS, Gustavo Martins Gomes dos. **Comparison of the conception rate to FTAI and *in vitro* embryo production among Nelore cows with high, intermediate and low antral follicles count**. 2013. 81 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the conception rates to FTAI and *in vitro* embryo production among Nelore cows with high, intermediate and low antral follicles count (AFC). In the experiment 1, Nelore beef cows (*Bos indicus*, n = 701), multiparous, at 40-60 days postpartum, and with BCE 3.0 ± 0.5 (range 1-5) were subjected to synchronization of ovulation. Randomly during the estrous cycle (D0), cows received an intravaginal device (CIDR®, Zoetis, Brazil) and 2mg BE (Estrogin®, Farmavet, Brazil), IM. At device removal (D8), cows received 0.51 mg PGF2α (Ciosin®, Intervet Schering-Plough, Brazil), 300IU eCG (Novormon®, Syntex SA, Argentina) and 1mg EC (ECP®, Pfizer, Brazil), IM . All cows were inseminated at fixed time (FTAI) 48 h after P4 device removal. Antral follicles ≥ 3 mm were counted using an intravaginal microconvex transducer (D8), and the cows were assigned into groups of high antral AFC (G-High, ≥ 25 follicles, n = 149), intermediate AFC (G-Intermediate, 11-24 follicles, n = 400) or low AFC (G-Low, ≤ 10 follicles, n = 152). The number of follicles was evaluated by Kruskal-Wallis and conception rates were compared by the chi-square test (p ≤ 0.05). The average number of antral follicles (mean ± SD) was 17.93 ± 8.45 and the average conception rate was 51.49% (361/701). The average follicular population was 30.70 ± 5.66 (G-High), 17.03 ± 3.28 (G-Intermediate) and 7.83 ± 2.42 follicles (G-Low, p <0.05) . There was no difference in the conception rates between high and low AFC groups (51.67 vs 60.50%), however, the conception rate of the low AFC group was higher compared to the intermediate AFC group (60.50 vs. 48.00%, p <0.05). Thus, we conclude that conception rates to FTAI for Nelore cows with low AFC was higher compared to cows with intermediate AFC. In the experiment 2, we compared the embryo production of cows with high, intermediate and low numbers of oocytes obtained by OPU. Nelore (*Bos indicus*, n = 66, 72-96 months) were subjected to ultrasound-guided follicular aspiration using an intravaginal microconvex array (7.5 MHz). Immediately after recovery, COCs were selected and transported to the laboratory. The IVF was performed with conventional semen from a single bull previously tested. Cows were assingned into groups according to the oocyte production as follows: G-High (n = 22, ≥ 40 oocytes), G-Intermediate (n = 25, 18-25 oocytes) and G-Low (n = 19, ≤ 7 oocytes). Data was analyzed by the chi-square test (p ≤ 0.05). The average number of COCs retrieved was 50.4 ± 11.3 (G-High), 21.4 ± 3.0 (G-Intermediate) and 5.3 ± 1.5 (G-Low, p <0.05). The mean number of viable oocytes was 40.4 ± 10.6 (G-High), 14.8 ± 3.0 (G-Intermediate) and 3.8 ± 1.1 (G-Low, p <0.05) and the percentage of viable oocytes was 80% (888/1,109, G-High), 69% (371/534, G-Intermediate) and 71% (72/101, G-Low, p <0.05). Cleavage rate was 79% (762/965, G-High), 74% (348/472, G-Intermediate) and 71% (65/92, G-Low, p <0.05), and blastocyst rate was 42% (405/965, G-High), 32% (153/472, G-Intermediate) and 13% (12/92, G-Low, p <0.05). The number of viable embryos was 18.4 ± 6.7 (G-High), 6.1 ± 3.6 (G-Intermediate) and 0.6 ± 0.7 (G-Low, P <0.05) and the percentage of vitrifiable embryos was 81% (329/405, G-High), 77% (118/153, G-Intermediate) and 58%

(7/12, G-Low, P <0.05). It is concluded that Nelore with high oocyte production had ~ 10-fold higher oocyte production and produced ~ 30-fold more embryos compared to the low AFC group. Nelore cows with high oocyte production presented better reproductive performance after *in vitro* embryo production. In summary, the AFC has a negative influence on the conception rates to FTAI, but influenced the *in vitro* embryo production.

Key words: Antral follicles. Conception rate. Oocytes. Embryos. Cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers et al., 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.....23

ARTIGO 1 – VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS ANTRAIS APRESENTAM DIFERENTES TAXAS DE CONCEPÇÃO APÓS PROTOCOLO DE IATF

Figura 1 – Protocolo hormonal de sincronização da ovulação utilizado em vacas de corte Nelore com alta CFA (G-Alta, ≥ 25 folículos), intermediária CFA (G-intermediário, 11-24 folículos) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤ 10 folículos) 61

Figura 2 – Frequência de distribuição de vacas de corte Nelore submetidas a protocolo hormonal de sincronização da ovulação, conforme a população folicular.....62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 – VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS ANTRAIS APRESENTAM DIFERENTES TAXAS DE CONCEPÇÃO APÓS PROTOCOLO DE IATF

Tabela 1 – População folicular média (± DP) e taxa de concepção à IATF de vacas de corte Nelore com alta CFA (G-Alta, ≥ 25 folículos), intermediária CFA (G-intermediário, 11-24 folículos) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤ 10 folículos) 63

ARTIGO 2 – VACAS NELORE COM ALTA PRODUÇÃO DE OÓCITOS APRESENTAM MAIOR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES QUANDO SUBMETIDAS À PROGRAMA DE OPU / PIVE

Tabela 1 – Média (± DP) performance reprodutiva de vacas de corte Nelore com alta (G-Alta, ≥ 40 oócitos), intermediária (G-Intermediária, 18 a 25 oócitos) e baixa (G-Baixa, ≤ 7 oócitos) número de oócitos recuperados por procedimento de OPU 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC/ CFA	*antral follicular counting* - contagem de folículos antrais
AMH	*anti-Müllerian hormone* - hormônio anti-Mülleriano
ANOVA	análise de variância
ART	*assisted reprodutive therapy* - tratamento reprodutivo assistido
FGF	*fibroblast growth factor* - fator de crescimento de fibroblasto
CL	*corpus luteum* - corpo lúteo
COCs	complexos *cumulus oophorus*
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - solução salina fosfato-tamponada Dulbecco
E2	estrógeno
EB	*estradiol benzoate* - benzoato de estradiol
eCG	*equine chorionic gonadotropin* - gonadotrofina coriônica eqüina
ET/ TE	*embryo transfer* - transferência de embriões
FOPA	folículos ovarianos pré-antrais
FSH	*follicle stimulant hormone* - hormônio foliculo estimulante
FTAI/ IATF	fixed-time artificial insemination - inseminação artificial em tempo fixo
GAP	junções intercomunicantes tipo GAP *junctions*
GDF-9	growth and differentiation factor - fator de crescimento e diferenciação
GFP	*green fluorescent protein* - proteína verde fluorescente
H3K4	hystone 3 at lysine 4 - histona 3 lisina 4
IETS	*international embryo transfer society* - sociedade internacional
IGF-I	*insulin-like growth factor* - fator de crescimento semelhante à insulina
IVC	*in vitro* culture - cultivo *in vitro*
IVF/ FIV	*in vitro fertilization* - Fecundação *in vitro*
IVM	*in vitro maturation* - maturação *in vitro*
IVP/ PIVE	*in vitro embryo production* - produção *in vitro* de embriões
LH	*luteinizing hormone* - hormônio luteinizante
LIF	*leukemia inhibitor factor* - fator inibidor de leucemia
MOET	*multiple ovulation embryo transfer* – múltipla ovulação e transferência de embrião
OPU	ovum pick up - aspiração folicular guiada por ultrassonografia
P4	progesterona

PC	*phosphatidylcholines* – fosfatidilcolinas
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandina
PL	*phospholipids* – fosfolipídeos
SD	*standard deviation* - desvio padrão
SM	*sphigomyelin* – esfingomielina
SOV	superovulação
TGA	triacilglicerol
TGF	*transforming growth factor* - fator transformador do crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1 O OVÁRIO DE MAMÍFERO 19
2.1.1 Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário 19
2.1.2 População Folicular Ovariana 20
2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE 20
2.3 FOLÍCULOS OVARIANOS 22
2.3.1 Classificação e Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Ovarianos 23
2.3.1.1 Folículos primordiais 24
2.3.1.2 Folículos primários 25
2.3.1.3 Folículos secundários 25
2.3.2 Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Antrais 25
2.3.3 Nutrição e sua Influência sobre a População Folicular Ovariana 27
2.4 CICLO ESTRAL 28
2.4.1 Regulação Endócrina do Ciclo Estral Bovino 29
2.4.2 Dinâmica Folicular Ovariana 30
2.4.3 Função do Corpo Lúteo Durante o Ciclo Estral 33
2.5 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM PROGRAMAS DE IATF 34
2.5.1 Sincronização da Emergência da Onda de Crescimento Folicular 34
2.6 ATRESIA FOLICULAR 35
2.7 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS 36

REFERÊNCIAS 39

3 HIPÓTESE 57

4 OBJETIVOS 58
4.1 OBJETIVO GERAL 58
4.2 OBETIVOS ESPECÍFICOS 58

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO 59
ARTIGO 1 – VACAS NELORE COM ALTA, INTERMEDIÁRIA E BAIXA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS ANTRAIS APRESENTAM DIFERENTES TAXAS DE CONCEPÇÃO APÓS PROTOCOLO DE IATF 59
Resumo 59
Introducão 60
Material e Métodos 60
Animais 60
Protocolo hormonal 61
Contagem de folículos antrais 61
Análise estatística 62
Resultados 62
Discussão 63
Referências 65
ARTIGO 2 – VACAS NELORE COM ALTA PRODUÇÃO DE OÓCITOS APRESENTAM MAIOR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES QUANDO SUBMETIDAS À PROGRAMA DE OPU/PIVE 70
Resumo 70
Introducão 70
Material e Métodos 71
Animais 71
Preparação das doadoras 71
Aspiração folicular e separação dos grupos 72
Produção in vitro de embriões 72
Análise estatística 74
Resultados 74
Discussão 75
Referências 76

6 DISCUSSÃO GERAL 79

7 CONCLUSÕES 81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (FAO, 2010) com aproximadamente 200 milhões de cabeças (IBGE, 2009), das quais, 80 a 85% são compostas por raças zebuínas e cruzamentos. Considerando o plantel zebuíno brasileiro, 90% correspondem a animais da raça Nelore (ABIEC, 2013), que se encontram distribuídos por todo território nacional e são considerados altamente adaptados as nossas condições de clima e são predominantementes criados extensivamente.

As biotecnologias da reprodução, tais como a inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a produção *in vivo* de embriões (SOV/TE) surgem como instrumentos fundamentais no arranque deste setor, favorecendo a seleção, a multiplicação e a disseminação de animais de alta genética e elevado potencial produtivo.

Com o conhecimento da fisiologia do ciclo estral dos bovinos, asociado a utilização de estratégias farmacológicas específicas, tornou-se possível o controle das fases de desenvolvimento folicular. O controle farmacológico do ciclo estral facilita não só o manejo reprodutivo, como também permite a aplicação das biotecnologias da reprodução nos rebanhos de leite e de corte, proporcionado uma produção mais eficiente (Baruselli et al., 2002)

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa vem estudando os fatores individuas, ligados a oôgenese e foliculogênese e sua influencia sobre o desempenho reprodutivo de bovinos, quando submetidos as biotecnologia reprodutivas (Ireland et al., 2011, Silva-Santos, 2013).

Os folículos pré-antrais são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (Guilbault et al., 1986). Entretanto, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais sofrem atresia folicular e não chegam até a ovulação (CARROL et al., 1990).

Alguns estudos relataram alta variabilidade no número de folículos pré-antrais e antrais entre bovinos (ERICKSON, 1966; Burns et al, 2005;. Silva-Santos et al, 2011, 2013). No entanto, o número de folículos antrais ≥ 3 mm de diâmetro é altamente repetível no mesmo indivíduo (0,85 a 0,95) durante as ondas de crescimento folicular (Ireland et al, 2007.; Mossa et al., 2012; Silva –Santos et al., 2013). Portanto, é possível identificar com o auxilio da ultrassonografia, fêmeas com

baixa, intermediária ou elevada quantidade de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular.

Estudos mostram que fêmeas taurinas com baixa contagem de folículos antrais (CFA) apresentam características usualmente associadas com infertilidade, tais como ovários menores, redução da reserva folicular ovariana, menor responsividade à superovulação e menor quantidade de embriões transferíveis, menor quantidade de hormônio anti-Mülleriano (AMH) e concentração de progesterona durante o ciclo estral, menor espessura endometrial e maior quantidade de marcadores de células do *cumulus* indicativos de menor qualidade do oócito (Ireland et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em comparar a taxa de concepção à IATF e a produção de embriões *in vitro* de fêmeas bovinas Nelore com alta, intermediária e baixa CFA recrutados por onda de crescimento folicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O OVÁRIO DE MAMÍFERO

2.1.1 Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário

O ovário é composto por uma região cortical e uma medular, circundado por epitélio superficial ou germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano (MURDOCH, 1996). O ovário mamífero é um órgão complexo composto de vários tipos celulares: oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares, presentes na região cortical do ovário, posteriormente se diferenciam em vários subtipos. Por exemplo, as células da granulosa diferenciam-se em células do cúmulus, murais ou luteais, enquanto que as células da teca desenvolvem-se em camadas internas e externas (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003).

A região cortical é composta por colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). No córtex ovariano, são encontrados folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou atresia, corpos lúteos, corpos álbicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996). A região medular, localizada na porção mais interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo fibroblástico (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e III), nervos, vasos sangüíneos e linfáticos. É responsável pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos) e uma endócrina ou esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteróides e de peptídeos; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A forma do ovário varia de acordo com a espécie e o estádio do ciclo estral (PINEDA, 1989; NUNEZ, 1993; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em bovinos, o ovário tem forma de amêndoa e o peso do ovário de vacas adultas varia de 10 a 20 g. O comprimento varia de 3,0 a 4,5 cm, e a largura, 1,5 a 2,0 cm, respectivamente (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.1.2 População Folicular Ovariana

A população folicular ovariana é influenciada por diversos fatores como espécie, raça (CAHILL ET AL., 1979), genética (ERICKSON, 1966; SMITH ET AL., 1994), idade, níveis hormonais (PETERS, 1976; RUSSE, 1983; ROY; TREACY, 1993) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON et al., 1976). Além destes, deve-se ressaltar a variação individual na população folicular ovariana, com valores entre 0 e 720.000 folículos por ovário para fêmeas bovinas (ERICKSON, 1966). Estima-se que a população folicular ovariana ao nascimento seja de aproximadamente 235.000 folículos na vaca (BETTERIDGE et al., 1989), 160.000 folículos pré-antrais na ovelha (DRIANCOURT et al., 1991), e 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). A estimativa da população folicular pré-antral em ovários de fêmeas bovinas de diferentes idades e raças já foi relatada, com valores de 143.929 e 285.155 folículos para fetos, 76.851 e 109.673 folículos para novilhas, e 39.438 e 89.577 folículos para vacas, *Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente (SILVA-SANTOS et al., 2011).

2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

Nas espécies domésticas, as fêmeas nascem com um estoque de oócitos, formado ainda no decorrer da vida fetal, como consequência de dois processos: a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991). Em ruminantes, a oogênese pode ser definida como o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, culminado com a formação do oócito haplóide fecundado (RUSSE, 1983). A foliculogênese é um processo fisiológico que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de *De Graaf* ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981). O término da foliculogênese ocorre no momento da ovulação do folículo maduro, enquanto a oogênese se encerra somente após a fecundação (FIGUEIREDO et al., 2002). Durante o desenvolvimento fetal, as células germinativas primordiais migram do saco vitelínico para as cristas gonadais, sofrem sucessivas mitoses originando as oogônias. Nesta etapa, células somáticas do mesonefron circundam as oogônias, formando os cordões corticais, que são os precursores dos folículos primordiais. Os cordões corticais ou ovígeros são descritos como estruturas alongadas contendo células germinativas circundadas por células da pré-granulosa, que repousam sobre

a lâmina basal (Juengel et al., 2002). As oogônias no seu interior sofrem sucessivas mitoses e diferenciam-se em oócitos, que iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I no estágio de diplóteno (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A formação dos folículos primordiais ocorre quando os oócitos são individualizados a partir da separação dos cordões de células germinativas (BRISTOL-GOULD et al., 2006).

Em fêmeas bovinas, o oócito primário ou imaturo permanece no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação. O processo de meiose é retomado em resposta à estimulação pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH; BUCCIONE et al.,1990), passando em seguida pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, ocorrendo a liberação do 1° corpúsculo polar e formação do oócito secundário (BETTERIDGE et al., 1989). O processo de maturação meiótica, *in vivo,* pode ocorrer apenas no oócito do folículo pré-ovulatório dominante e resulta, dentre outros fatores, da estimulação específica pelo pico pré-ovulatório de LH e FSH (ERICKSON, 1986).

No estágio de metáfase II, ocorre uma segunda interrupção da meiose (BETTERIDGE et al., 1989). Na maioria das espécies domésticas, o oócito permanece em metáfase II até ser ovulado e transportado para o oviduto, onde poderá ser fecundado. Caso a fecundação ocorra, o oócito retoma a meiose (BETTERIDGE et al., 1989; BUCCIONE et al.,1990) e culmina com a extrusão do segundo corpúsculo polar (GORDON, 1994), marcando assim o fim da oogênese.

Apesar do conceito do estoque finito e não renovável de células germinativas (ZUCKERMAN, 1951) ser amplamente aceito, Johnson et al. (2004 e 2005) surpreenderam a comunidade científica ao demonstrarem indícios de continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, apontando as células-tronco da medula óssea como responsáveis pela renovação dos gametas femininos. Estes pesquisadores sugerem a ocorrência de células germinativas nos ovários, na medula óssea e no sangue periférico. Os trabalhos de Johnson et al. (2004 e 2005) geraram muita controvérsia no meio científico. Um dos aspectos refere-se à ocorrência da menopausa e a inatividade ovariana em fêmeas senis. As críticas também estão relacionadas à ausência de sinais de início e término da primeira prófase meiótica e subsequente fase de diplóteno nos supostos oócitos derivados de células-tronco. Além disso, o curto período para crescimento dos novos folículos permitiu o questionamento da eficácia da esterilização química. A teoria de

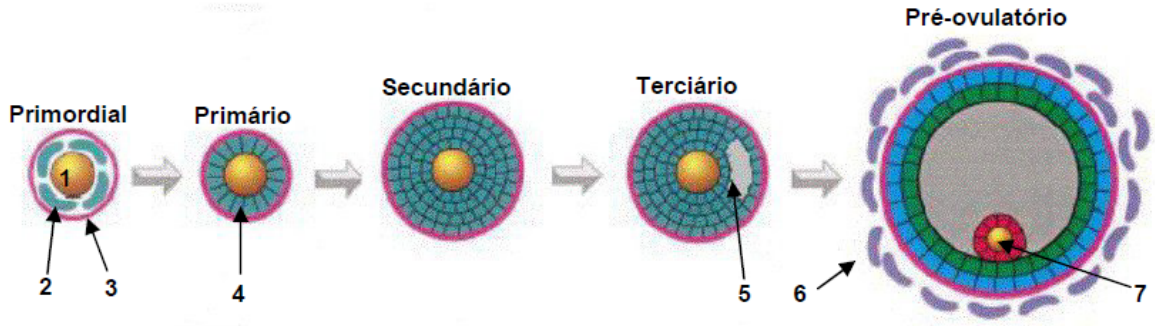
neo-oogênese/foliculogênese proposta por Johnson et al. (2004 e 2005) é polêmica e desafia um conceito de mais de 100 anos. A polêmica não parece estar próxima do fim, principalmente depois do relato do nascimento de camundongos a partir de oócitos neoformados depois do cultivo de células germinativas de ovários de camundongos adultos transgênicos para proteína GFP e transferência para ovários de fêmeas esterilizadas quimicamente (ZOU et al., 2009). Depois dos primeiros relatos do grupo de Johnson e Tilly, diversos estudos mostraram-se a favor da neo-foliculogêne (ABBAN; JOHNSON; BUKOVSKY et al.; CELIK et al.; ZOU et al.; 2009; DE FELICI; PACCHIAROTTI et al.; PARTE et al.; VIRANT-KLUN; SKUTELLA, 2010; VIRANT-KLUN et al., 2011. e outros concluem não haver renovação folicular (BRISTOL-GOULD et al.; EGGAN et al., 2006; LIU et al., 2007; BEGUM et al., 2008; FADDY; GOSDEN 2009; ZHANG et al., 2010; BYSKOV et al., 2011). Recentemente, este grupo relatou, semelhante ao que occore em camundongas adultas, ovários provenientes de mulheres em idade para reprodução possuem células germinativas mitoticamente ativas que podem ser propagadas *in vitro* e gerar oócitos *in vitro* e *in vivo* (WHITE et al., 2012). Apesar da questão permanecer em discussão, os trabalhos sugerem revisão dos conceitos sobre foliculogênese.

2.3 FOLÍCULOS OVARIANOS

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, constituído por um oócito circundado por células somáticas da granulosa e tecais. O folículo apresenta funçãos endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e exócrina ou gametogênica, apresentando-se como elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária. Dessa forma, o folículo proporciona um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito imaturo e permite que o oócito maduro alcance a ovulação (FIGUEIREDO et al., 2002).

A população de folículos ovarianos localiza-se no córtex ovariano. Os folículos são classificados em pré-antrais ou não cavitários (primordiais, em transição, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (terciários e préovulatórios; Figura 1), de acordo com o grau de evolução folicular.

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers et al., 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.



Na fase inicial do crescimento folicular, admite-se uma ação predominantemente local e vários fatores de crescimento foram identificados nas primeiras modificações foliculares. Dentre os mais estudados, encontram-se o *Kit Ligand* (PARROT; SKINNER, 1999), fator de crescimento e diferenciação - GDF-9 (VITT el al., 2000), fator de crescimento de fibroblasto - bFGF (NILSSON et al., 2001) e fator inibidor de leucemia - LIF (NILSSON et al., 2002).

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (GUILBAULT et al., 1986). No entanto, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais presentes nos ovários não chegam até a ovulação (CARROL et al., 1990), pois sofrem um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia. Dessa forma, o ovário pode ser considerado um órgão de baixíssima produtividade (IRELAND, 1987).

Existe controvérsia sobre o aparecimento de folículos primordiais em ovários de fetos bovinos, com relatos ao redor 74 (TANAKA et al., 2001), 90 (RUSSE, 1983) e 150 dias de gestação (MOUSTAFA; HAFEZ, 1971).

2.3.1 Classificação e Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Préantrais

Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados de acordo com a forma e o número de camadas de células que circundam o oócito imaturo em primordiais, primários e secundários (FIGUEIREDO et al., 2002). Os folículos primordiais e primários não podem ser distinguidos pelo diâmetro, mas sim, por

diferenças morfológicas (HULSHOF et al., 1994). Os folículos primordiais apresentam um oócito rodeado por uma camada de 4 a 8 células da granulosa achatadas, os primários mostram um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa cuboidais e os secundários, mais de uma camada de células da granulosa cuboidais. Os folículos pré-antrais podem ser classificados também de acordo com o grau de viabilidade em folículos saudáveis (com lâmina basal intacta, oócito com não mais de três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolos intactos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação da cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente; BUTLER, 1970; WANDJI et al., 1996).

2.3.1.1 Folículos primordiais

Na espécie bovina, ao redor de 130 dias de gestação, uma camada de células somáticas planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, circundam o oócito primário ou imaturo (em prófase I), formando o primeiro e mais primitivo dos estádios foliculares, o folículo primordial. Após sua formação, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência. A proliferação celular é retomada somente quando o folículo primordial (quiescente) começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991). Os folículos primordiais possuem 30-40 µm de diâmetro. O oócito possui 20-25 µm de diâmetro (BECKERS et al., 1996) e o núcleo do oócito ocupa posição central com nucléolo evidente. As organelas estão uniformemente distribuídas no citoplasma ou bem próximas ao núcleo. A mitocôndria é a organela mais evidente e é predominantemente arredondada. O retículo endoplasmático liso e o Complexo de Golgi são pouco desenvolvidos e várias vesículas estão espalhadas pelo citoplasma (LUCCI et al., 2001). A grande maioria dos oócitos no ovário é armazenada nos folículos primordiais. Os mecanismos envolvidos no recrutamento e na ativação desses folículos ainda não são bem estabelecidos. Presume-se que em 100 dias o folículo primordial bovino atinja o estágio pré-ovulatório (BRITT, 1991).

2.3.1.2 Folículos primários

Uma vez recrutado, o folículo primordial evolui para folículo primário, cujas células granulosas apresentam formato cuboide (HULSHOF et al., 1994), presentes em maior quantidade e mais volumosas (VAN DER HURK et al., 1997). Em bovinos, o folículo e o oócito nele contido medem, respectivamente, 40-60 µm e 30-40 µm de diâmetro (BECKERS et al., 1996). Nessa fase, há o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida por todo o desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2002).

Assim como nos folículos primordiais, o citoplasma dos oócitos dos folículos primários também contém numerosas mitocôndrias arredondadas. Com o desenvolvimento do folículo, a mitocôndria torna-se alongada (LUCCI et al., 2001).

2.3.1.3 Folículos secundários

Com o aumento do oócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca (VAN DER HURK et al., 1997) e pelo menos duas camadas da granulosa, o folículo secundário encontra-se constituído (HULSHOF et al., 1994). O folículo secundário atinge 60-200 µm de diâmetro em vacas (FIGUEIREDO et al., 2002).

No folículo secundário, o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica, situando-se na região entre a zona pelúcida e o centro do oócito. As organelas também se movem e ficam mais próximas à periferia (HYTTEL et al., 1997). O retículo endoplasmático liso aumenta de tamanho e a grande maioria das mitocôndrias são alongadas (LUCCI et al., 2001). Nos folículos secundários e estágios subsequentes, a comunicação entre as células da granulosa e o oócito é feita por junções intercomunicantes (GAP *junctions*; HYTTEL et al*.,* 1997).

2.3.2 Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Antrais

A categoria de folículos antrais compreende os folículos terciários e os folículos *De Graaf* ou também conhecidos como maduros ou pré-ovulatórios. Com a intensa proliferação das células da granulosa, há o surgimento do antro folicular,

uma área preenchida por fluido folicular, característica do folículo antral (FIGUEIREDO et al., 2002). O surgimento dos primeiros folículos terciários em bovinos é observado aos 230 dias de gestação (ERICKSON, 1966; RUSSE, 1983). Nesta espécie, a cavidade antral pode se desenvolver em folículos cujos diâmetros variam de 0,14-0,28 mm (LUSSIER et al., 1987). Os folículos crescem em tamanho e o diâmetro dos folículos primordiais aumenta de 0,020-0,040 mm (bovinos) para mais de 10 mm antes da ovulação (IRELAND, 1987). São necessários dois ciclos estrais para um folículo crescer do início da formação do antro (0,13 mm) ao tamanho pré-ovulatório (LUSSIER et al., 1987).

Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e teca externa; GORDON, 1994). Caracterizam-se pela presença de numerosas microvilosidades dentro da zona pelúcida, bem como de numerosas partículas lipídicas e mitocôndrias arredondadas e alongadas. Um maior número de complexos de Golgi pode ser observado e os grânulos corticais estão distribuídos no ooplasma, podendo-se evidenciar ainda os microtúbulos (FAIR et al., 1997). Os folículos de *De Graaf* representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular. Neles predominam mitocôndrias arredondadas, mas mitocôndrias encapuzadas, que caracterizam o completo crescimento do oócito em bovinos, também são encontradas. Retículo endoplasmático liso e rugoso são observados em grande quantidade. Podem ser identificados grânulos da cortical e microtúbulos no ooplasma do oócito. O espaço perivitelino é formado neste estágio de desenvolvimento e há um aumento no número de vesículas e de complexos de Golgi. É também no final deste estágio que a função do nucléolo é inativada, como indica a marginalização dos centros fibrilares, sinalizando uma presumível retração dos genes rRNA do nucléolo. Concomitantemente, a atividade transcricional do oócito é diminuída. Foi demonstrado, entretanto, que a transcrição de mRNA não é completamente inativada com o crescimento total do oócito (HYTTEL et al., 1997).

A população de folículos antrais é altamente variável entre indivíduos, entretanto, mantém alta repetibilidade individual (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007, 2008). A variação na população de folículos antrais entre indivíduos durante as ondas de crescimento folicular está associada com a expressão de genes envolvidos na produção de estradiol pelas células da granulosa

(CYP19A1), na regulação da atividade do FSH (hormônio anti-Mülleriano - AMH), na diferenciação e no funcionamento das células tecais (TBC1D1), na responsividade ao estradiol (ESR1, ESR2) e com determinantes da qualidade do oócito nas células do cumulus (CTSB, IRELAND et al., 2009). O AMH é uma glicoproteína de 140 kDa que pertence à família do fator transformador do crescimento (TGF-β), produzido nas células da granulosa e que é expresso somente nas gônadas (VIGIER et al., 1984; CATE et al.; TAKAHASHI et al., 1986; LEE et al., 1996; MONNIAUX et al., 2008). O AMH é um ótimo marcador endócrino para o número de folículos em crescimento, já que inibe o recrutamento de folículos primordiais para o *pool* de folículos em crescimento, além de reduzir a responsividade dos folículos em crescimento ao FSH (DI CLEMENTE et al., 1996; DURLINGER et al., 1999, 2001, 2002). Atualmente, o AMH é o melhor marcador endócrino da reserva ovariana em humanos (VAN ROOIJj et al., 2002; GRUIJTERS et al., 2003; VISSER et al., 2005, 2006) e tem sido utilizado na reprodução assistida para predizer a resposta a tratamentos estimulatórios em mulheres (MUTTUKRISHNA et al., 2004, 2005; ELDAR-GEVA et al., 2005; PENARRUBIA et al., 2005; EBNER et al., 2006; MCLLVEEN et al.; SMEENK et al., 2007; ELGINDY et al.; KWEE et al., 2008). A contagem de folículos antrais (CFA) também pode ser utilizada em tratamentos superestimulatórios para prever baixa resposta ovariana em humanos (HENDRIKS et al., 2005, 2007), com a mesma acurácia e valor clínico do AMH (BROER et al., 2009).

2.3.3 Nutrição e sua Influência sobre a População Folicular Ovariana

Uma vez que o conjunto de folículos primordiais é estabelecido nos bovinos durante o segundo trimestre de gestação, é provável que o tamanho da reserva folicular possa ser influenciada pelo ambiente uterino em que o feto é formado. Um fator que pode ser relacionado com o número de folículos primordiais formados é o estado nutricional da mãe. Mossa et al. (2009) avaliaram vacas que receberam alimentação de mantença ou foram submetidas à restrição alimentar (60% das necessidades energéticas de manutenção) nos primeiros 110 d de gestação e, posteriormente, avaliaram os ovários de suas bezerras com 7, 18 e 35 semanas de idade. A contagem de folículos antrais das bezerras com diferentes idades, cujas vacas foram submetidas à restrição alimentar foi em média 60% menor

do que a das bezerras do grupo das vacas que receberam alimentação de mantença. Estes dados indicam que a nutrição durante o início da gestação tem influência direta sobre o tamanho da reserva folicular ovariana.

Há também evidências indicando que o comprometimento da saúde materna durante a gestação bovina também pode afetar negativamente o tamanho da reserva folicular. Vacas com contagem elevada de células somáticas no leite, o que é indicativo de infecção da glândula mamária, deram origem a bezerras que apresentaram menor concentração de AMH em comparação a bezerras nascidas de vacas com baixa contagem de células somáticas (IRELAND et al., 2011; EVANS et al., 2012). O nível de AMH sérico de fêmeas bovinas tem sido correlacionado com a contagem de folículos antrais e com o tamanho da reserva folicular ovariana bovina (IRELAND et al., 2011). Estes resultados indicam que os fatores como a nutrição e saúde materna durante a gestação podem afetar o número de folículos formados durante a vida fetal.

2.4 CICLO ESTRAL

Os bovinos domésticos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) são considerados animais poliéstricos anuais e exibem o comportamento estral aproximadamente a cada 21 dias (ROCHE, 1996).

O ciclo estral representa um padrão cíclico de atividade ovariana que permite as fêmeas em período reprodutivo mudarem de uma condição de não receptividade a receptividade, acasalamento e posterior progresso gestacional (FORDE et al., 2011). Primariamente, o ciclo estral surge durante a puberdade, em novilhas taurinas ao redor de seis a 12 meses de idade ou quando a fêmea atinge 40 a 50% do peso corporal adulto (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007) e em novilhas zebuínas ao redor de 15 a 18 meses de idade ou quando atinge de 60 a 70% do peso corporal adulto (NOGUEIRA, 2006).

Durante o ciclo estral, há duas ou três ondas de crescimento folicular ovariana (GINTHER et al., 1989). Cada onda consiste em um período de emergência de um grupo de folículos, seleção de um folículo dominante (FD) e atresia ou ovulação do FD (FORDE et al., 2011). Estas ondas de crescimento folicular, inicialmente estabelecida durante o período pré-puberal, ocorrem durante todo o

ciclo estral com a maturação e a ovulação apenas do FD (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007).

Em bovinos o ciclo estral possui uma duração normal de 18 a 24 dias, sendo constituído por duas fases: a fase lútea ou progesterônica com duração de 14 a 18 dias e a fase folicular ou estrogênica com duração de quatro a seis dias. A fase lútea, também denominada de fases de metaestro e diestro, compreende o período seguinte à ovulação, ou seja, período em que o corpo lúteo (CL) é formado. A fase folicular, também designada de fases de pró-estro e estro, compreende o período após o desaparecimento do CL (luteólise) até o momento da ovulação. É nesta fase que ocorre a maturação final e a ovulação do folículo pré-ovulatório, promovendo a liberação do oócito no oviduto para fertilização (FORDE et al., 2011).

2.4.1 Regulação Endócrina do Ciclo Estral Bovino

Nos bovinos, as funções ovarianas como recrutamento e crescimento folicular, ovulação, luteinização e luteólise são reguladas pelos hormônios hipotalâmicos (Hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH), hipofisários (FSH e LH), ovarianos (P_4, Estradiol - E_2 e Inibinas) e uterinos (Prostaglandina - $PGF_{2\alpha}$). Estes hormônios funcionam por meio de um sistema de *feedback* positivo e negativo para controlar o ciclo estral (ROCHE, 1996; CROWE, 2008; FORDE et al., 2011).

No controle do ciclo estral, o papel do GnRH está fundamentado em ações sobre a hipófise anterior ou adeno-hipófise, promovendo a liberação de gonadotrofinas produzidas na hipófise posterior ou neuro-hipófise (FORDE et al., 2011). Após o transporte do GnRH no sistema porta hipotalâmico hipofisário, o GnRH se liga aos receptores de superfície celular e sinaliza a liberação de FSH e LH (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). O FSH é armazenado em grânulos secretores localizados no citoplasma por curtos períodos de tempo, enquanto o LH é armazenado por períodos mais longos durante o ciclo estral (FARNWORTH, 1995).

Durante a fase folicular do ciclo estral o CL sofre regressão, resultando em concentrações basais de P_4. Concomitante a redução das concentrações plasmáticas de P_4, há um aumento nas concentrações de E_2 devido ao rápido desenvolvimento do FD, isso induz um aumento na liberação de GnRH e

permite a exibição de comportamento do estro, durante o qual, vacas / novilhas são sexualmente receptivas à monta (FORDE et al., 2011).

A ovulação do FD ocorre somente quando as concentrações séricas de P_4 são basais e as frequências de pulsos de LH ocorrem a cada 40 a 70 minutos por dois a três dias. Cerca de 10 a 14 horas após o estro acontece à ovulação, posteriormente, inicia a fase de metaestro com duração de três a quatro dias. Esta fase é caracterizada pela formação do CL a partir do corpo hemorrágico, que é resultante do rompimento do folículo pré-ovulatório (ROCHE, 1996).

Após a ovulação, as células da granulosa e da teca interna sofrem luteinização e formam o CL, responsável pela produção de P_4 necessária para manter a gestação ou o diestro. Na fase de diestro, as concentrações de P_4 permanecem elevadas e os folículos recrutados continuam o desenvolvimento devido à liberação do FSH pela hipófise anterior. Entretanto, os folículos que crescem durante esta fase tem a ovulação bloqueada pelos altos níveis de P_4 que por meio de *feedback* negativo, não permitem frequências e/ou amplitudes adequadas nos pulsos de LH, bloqueando a ovulação e induzindo atresia do FD (CROWE, 2008). Durante a fase de pró-estro, o CL sofre regressão em resposta a secreção de $PGF_{2\alpha}$ uterina, as concentrações de P_4 diminuem drasticamente não ativando o *feedback* negativo e permitindo a ovulação (FORDE et al., 2011).

2.4.2 Dinâmica Folicular Ovariana

A dinâmica folicular representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana, sendo amplamente estudada nas diversas raças taurinas ou zebuínas (FIGUEIREDO et al., 1997; MACKEY et al., 2000; COUTINHO et al., 2007; CUERVO-ARANGO et al., 2011).

Tanto o FSH quanto o LH possuem papel fundamental no desenvolvimento dos folículos ovarianos, uma vez que o crescimento folicular está envolvido com os mecanismos de *feedback* positivo e negativo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, E_2 e inibinas. O crescimento, o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos são processos fundamentais para alta eficiência reprodutiva em animais de produção. Durante a vida fetal é estabelecido um número fixo de folículos primordiais. Com o desenvolvimento fetal, os folículos ovarianos iniciam um

período de desenvolvimento de três a quatro meses caracterizado por estágios independente e dependente de gonadotrofina (WEBB et al., 2004).

A emergência de uma onda de crescimento folicular é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos que coincide com aumento transitório nas concentrações de FSH (SUNDERLAND et al., 1994). Neste período, o desenvolvimento folicular é marcado pela presença de receptores de FSH localizado nas células da camada granulosa dos folículos por um período de três dias, permitindo que o FSH execute a sinalização, o crescimento e a proliferação celular (GINTHER et al., 2002).

No processo de seleção folicular, o número de folículos recrutados é reduzido para quota ovulatória da espécie, geralmente um na bovina (SUNDERLAND et al., 1994). Nesta fase há um aumento transitório nas concentrações de FSH, induzindo o aumento na atividade da enzima aromatase, presente nas células da camada granulosa, que converte andrógeno em estrógeno (HILLIER, 1994).

À medida que o FD emerge do grupo de folículos recrutados, o diâmetro folicular aumenta e este é reconhecido como o maior folículo saudável do grupo. A divergência ou dominância folicular é estabelecida quando o maior folículo possui um diâmetro médio de 8,5 mm em animais *Bos taurus* (GINTHER et al., 1999) e 5,7 mm para novilhas e 6,1 mm para vacas *Bos indicus* (Nelore); (SARTORELLI et al., 2005). Numa taxa de crescimento folicular de 0,92 mm/dia (FIGUEIREDO et al., 1997) o FD alarga seu diâmetro e promove um aumento nas concentrações de E2 e inibina no fluido folicular, suprimindo as concentrações de FSH na hipófise anterior por *feedback* negativo e reduzindo os níveis de FSH a concentrações basais (SUNDERLAND et al., 1994).

O FD selecionado torna-se cada vez mais sensível ao LH e continua o crescimento frente a concentrações decrescentes de FSH. Independente da fase do ciclo estral, o alternar da dependência de FSH para dependência de LH, acontece pela presença de receptores de LH localizados nas células da teca e da granulosa dos folículos saudáveis em diferentes estágios de desenvolvimento. À medida que o folículo cresce os receptores de LH da teca e da granulosa aumentam e o folículo torna-se dominante. Além disso, evidências sugerem aumentos transitórios de LH na circulação, próximo do tempo de seleção do folículo, permitindo

que o FD continue produzindo E_2 e crescendo, mesmo em um ambiente com menor concentração de FSH (CROWE, 2008; FORDE et al., 2011).

O destino do FD é dependente das frequências e amplitudes de pulso do LH (CROWE, 2008). Durante a fase lútea inicial, a pulsatilidade do LH é de amplitude menor e de frequência maior (20 a 30 pulsos/24 horas), no meio da fase lútea os pulsos do LH passam a ser de amplitude maior e de frequência menor (seis a oito pulsos/24 horas). Esta amplitude e frequência ainda são insuficientes para promover a maturação final do FD e a ovulação. Portanto, o FD selecionado durante a fase lútea do ciclo estral sofre atresia, e a produção de E_2 e inibina diminui, removendo o bloqueio de *feedback* negativo sobre a secreção de FSH no hipotálamo/hipófise. Com aumento da secreção de FSH, emerge uma nova onda folicular (FORDE et al., 2011).

A produção de E_2 em elevadas concentrações é uma característica essencial do FD, uma vez que antes mesmo das diferenças visíveis no diâmetro folicular, o suposto FD tem maiores concentrações de E_2 no fluido folicular quando comparado aos outros folículos da onda (SUNDERLAND et al., 1994). A síntese de E_2 é dependente da produção de andrógenos nas células da teca e da transformação de andrógeno em E_2 nas células da granulosa. A produção de E_2 a partir de folículos em crescimento depende da frequência de pulso de LH. A ligação do LH aos seus receptores nas células da teca impulsiona a conversão de colesterol em testosterona por meio de uma série de reações catalíticas. Uma vez produzida, a testosterona difunde-se das células da teca para as células da granulosa, onde é convertida em E_2 pela enzima aromatase (HILLIER, 1994).

O E_2 tem um efeito local sobre o desenvolvimento folicular e um papel sistêmico no mecanismo de *feedback* positivo no hipotálamo e hipófise. Durante a fase folicular do ciclo estral, quando as concentrações de P_4 são altas, o E_2 produzido pelo FD pré-ovulatório induz aumento de GnRH a partir do hipotálamo, promovendo aumento na amplitude e na frequência dos pulsos de LH, suficiente para estimular a maturação final e ovulação do FD (SUNDERLAND et al., 1994; CROWE, 2008). Tanto em novilhas, quanto em vacas *Bos indicus* o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório é de 10 a 12 mm (FIGUEIREDO et al., 1997) e em *Bos taurus* é de 14 a 20 mm (GINTHER et al., 1989).

Fatores intraovarianos também desempenham um papel importante na regulação do ciclo estral, seja de forma indireta através da alteração na síntese

de E_2, ou de forma direta através do mecanismo de *feedback* negativo, controlam o hipotálamo e a hipófise (FORDE et al., 2011). Embora a aquisição de receptores de LH pelas células da camada da granulosa seja considerada o principal mecanismo que favorece o processo de seleção do folículo (LUCY, 2007) outros mecanismos como, a biodisponibilidade do fator de crescimento insulínico (IGF); (RIVERA; FORTUNE, 2003) e a presença de outros fatores de crescimento (KNIGHT; GLISTER, 2006) também favorecem o crescimento, a proliferação e a capacidade esteroidogênica do FD (CANTY et al., 2006).

2.4.3 Função do Corpo Lúteo Durante o Ciclo Estral

Após a ovulação, as células da teca e da camada granulosa do folículo ovulatório sofrem luteinização por ação do LH e formam o CL (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). A função do CL é produzir concentrações suficientes de P_4 durante toda a fase lútea do ciclo estral, seja para impedir o comportamento do estro ou para manter a gestação se o concepto estiver presente (LAMB et al., 2010).

Em fêmeas da raça Nelore o diâmetro máximo do CL é de 15 a 18 mm, sendo maior em novilhas que em vacas (FIGUEIREDO et al., 1997). Os níveis de P_4 aumentam rapidamente entre o 3° e o 12° dia do ciclo estral, permanecendo relativamente constante até a regressão fisiológica do CL, no 16° dia para o ciclo com duas ondas de crescimento folicular e no 19° dia para o ciclo com três ondas de crescimento folicular, resultando em uma menor e maior duração do ciclo estral, respectivamente (ADAMS; JAISWAL, 2008).

Em bovinos o reconhecimento materno da gestação ocorre entre o 15° e o 17° dia do ciclo estral, devido à presença do *interferon-tau* (INFτ) produzido pelo trofoblasto do concepto em desenvolvimento (LAMB et al., 2010). Se o INFτ não for detectado em quantidade suficiente, a luteólise ocorre. A lise do CL é desencadeada pela ligação de ocitocina aos seus receptores localizados no útero que induz a secreção de $PGF_{2\alpha}$ no endométrio uterino. Tal regressão acontece através do mecanismo luteolítico de contracorrente entre a veia uterina e a artéria ovariana que permite a transferência da $PGF_{2\alpha}$ da veia para a artéria (FORDE et al., 2011). Isto reduz as concentrações circulantes de P4, aumenta as concentrações de

E_2, estimula a liberação de GnRH no hipotálamo e faz o animal entrar na fase folicular do ciclo estral (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.5 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM PROGRAMAS DE IATF

Com o conhecimento da fisiologia do ciclo estral dos bovinos, tornou-se possível o controle das fases de desenvolvimento folicular (recrutamento, seleção e ovulação), graças à utilização de estratégias farmacológicas especificas. O controle farmacológico do ciclo estral facilita não só o manejo reprodutivo, como também permite a aplicação das biotecnologias da reprodução nos rebanhos de leite e de corte, proporcionado uma produção mais eficiente.

Os primeiros protocolos de sincronização do estro focavam na regressão do CL com uma aplicação de $PGF_{2\alpha}$ e na detecção do estro, ou envolvia o uso de P_4 exógena que impedia a ocorrência do estro. Posteriormente, foram desenvolvidos protocolos que combinavam a utilização de P_4 exógena com a aplicação de $PGF_{2\alpha}$. Finalmente, hormônios liberadores de gonadotrofinas passaram a ser empregado nos protocolos para controlar a onda de crescimento folicular, sincronizar a ovulação ou luteinizar folículos dominantes (LAMB et al., 2010).

O emprego de hormônios liberadores de gonadotrofinas nos protocolos de sincronização do ciclo estral deu origem aos protocolos de IATF. Nestes protocolos, além do ciclo estral, a ovulação também passou a ser sincronizada permitindo a inseminação de um grande número de fêmeas em um momento pré-estabelecido sem a necessidade de observação do estro.

São conhecidas três condições fundamentais para o controle da dinâmica folicular e luteínica em programas de IATF de bovinos: a sincronização da emergência de uma onda de crescimento folicular, através de agentes indutores da ovulação ou da atresia folicular; o controle na duração da fase progesterônica, através de agentes luteolíticos ou fontes exógena de P_4; e a indução sincronizada da ovulação do FD (BARUSELLI et al., 2010).

2.5.1 Sincronização da Emergência da Onda de Crescimento Folicular

A emergência da onda de crescimento folicular pode ser sincronizada por ablação mecânica do FD, por indução da ovulação ou por indução

de atresia folicular (BARUSELLI et al., 2010).Embora este método seja eficiente, sua aplicação é muito trabalhosa e acaba inviabilizando o emprego em larga escala.

A ovulação pode ser induzida diretamente com a aplicação de LH ou hCG que se ligam aos receptores de LH no FD, ou indiretamente pela aplicação de GnRH que promove secreção pulsátil do LH (BARUSELLI et al., 2010). Após a ovulação, há uma queda na secreção de E_2 e inibina e desbloqueio da secreção de FSH. Com a descarga de FSH, tem-se emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 24 a 48 horas (GINTHER et al., 1996).

O uso de E_2 em associação com a P_4 endógena (produzida pelo CL) ou exógena (dispositivos/implantes) diminui os níveis circulantes de FSH e LH e promove a regressão dos folículos ovarianos dependentes de gonadotrofinas. A medida que o E_2 vai sendo metabolizado ocorre elevação dos níveis de FSH com subsequente emergência de uma nova onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2010).

A associação de valerato de estradiol (VE); (BÓ et al., 1995) ou de cipionato de estradiol (CE); (COLAZO et al., 2003) com P_4 causam a regressão dos folículos antrais presentes no ovário. Entretanto, devido à meia vida longa e a baixa solubilidade destes ésteres, há uma dispersão no dia da emergência da onda de crescimento folicular (SÁ FILHO et al., 2011). O benzoato de estradiol (BE); (SÁ FILHO et al., 2004) e o 17β-estradiol (BÓ et al., 1994) possuem uma meia vida mais curta, logo uma onda sincrônica de crescimento folicular é induzida entre três e quatro dias após o tratamento (BARUSELLI et al., 2010). A administração de 2 mg de BE por via intramuscular (IM) em associação com uma fonte P_4 é uma das formas mais utilizadas para induzir o aparecimento de uma nova onda de crescimento folicular em programas de IATF.

2.6 ATRESIA FOLICULAR

Como mencionado anteriormente, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais presentes nos ovários não chegam até a ovulação, sofrendo processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia. A atresia folicular não é igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento folicular (FORTUNE,1994). A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que parece ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados

até chegar à ovulação. A duração precisa, bem como o estádio no qual os folículos ovarianos são mais susceptíveis de sofrer atresia, não são conhecidos (HENDERSON et al., 1987). O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos nesta fase de desenvolvimento (MORITA; TILLY, 1999). Em folículos pré-antrais, alterações nas células da granulosa são raramente observadas (JORIO et al., 1991). É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa. O aparecimento de células da granulosa com núcleos picnóticos, onde se observa condensação da cromatina e retração nuclear, podem ser considerados como os primeiros sinais morfológicos de atresia, que são observados predominantemente em células da granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Com a progressão da atresia, observa-se redução no número de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após estas drásticas mudanças na camada granulosa o oócito, frequentemente, sofre pseudomaturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974). Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, consequentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2002).

2.7 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS E TAURINAS

Existem diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus indicus* (*Bos indicus*) e *Bos taurus taurus* (*Bos taurus*) que devem ser consideradas, pois implicam em diferentes técnicas de manejo e respostas a tratamentos hormonais. O conhecimento dessas particularidades é fundamental para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2007). Com relação ao estro

comportamental, existem diferenças observadas entre raças (RAE et al., 1999), e embora ainda não completamente elucidadas, entre grupos genéticos (zebuínos e taurinos). Fêmeas *Bos indicus* geralmente apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas), o que dificulta sua detecção (BÓ et al., 2003). Além disso, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de estro no período noturno (entre 18:00 e 6:00 horas; PINHEIRO et al., 1998; MEMBRIVE, 2000), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (Pinheiro et al., 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de estro. Em condições brasileiras de manejo, a avaliação do comportamento reprodutivo de vacas de corte com auxílio de radiotelemetria (*Heat-Watch*) mostrou que a duração do estro em *Bos indicus* é menor do que em *Bos taurus* (12,9 ± 2,9 horas em Nelore vs. 16,3±4,8 horas em Angus; MIZUTA, 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferenças entre estas duas raças (Nelore, 27,1±3,3 horas vs. Angus, 26,1± 6,3 horas).

Considerando o número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral, animais da raça Holandesa apresentam predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al*.,* 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004). Entretanto, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000). Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* (33,4 ± 3,2 vs 25,4 ± 2,5; CARVALHO et al., 2008). Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de transferência de embriões e de OPU-PIV, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas. Utilizando-se o método de lavagem uterina, a média de embriões obtidos é similar entre esses grupos genéticos (CASTRO-NETO et al., 2005). No entanto, a média de oócitos recuperados por aspiração folicular é maior para fêmeas zebuínas (média de 18 a 25 oócitos; WATANABE et al., 1999; THIBIER, 2004; RUBIN et al., 2004) do que para taurinas (média de 4 e 14 oócitos por sessão de aspiração folicular; MACHADO et al., 2003; RUBIN et al., 2005; MARTINS JR et al., 2007). Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade

durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997; BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2009). Alguns autores levantaram a hipótese de que a possibilidade de um maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* poderia ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ et al., 2003). Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I pode explicar a maior sensibilidade ao tratamento superovulatório em doadoras *Bos indicus* (BARROS; NOGUEIRA, 2001). Existem relatos que confirmam que é possível reduzir consideravelmente a dose de FSH para superovular fêmeas Nelore (BARUSELLI et al., 2003), empregando doses inferiores às usualmente utilizadas para *Bos taurus*. Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e a divergência folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (ADAYEMO; HAETH, 1980; SARTORELLI et al., 2005). Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*), a divergência tem início por volta do dia 2,8 após a emergência (GINTHER et al., 1996) e, em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), 2,5 a 2,7 dias após a ovulação (GIMENES et al., 2005; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006). O diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular também difere entre fêmeas *Bos taurus* (17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda; GINTHER et al., 1989) e *Bos indicus* (11,3 e 12,1 mm, respectivamente; FIGUEIREDO et al., 1997). Para animais com três ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos foram de 16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (GINTHER et al., 1989) e 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997). O diâmetro do corpo lúteo também parece ser menor em *Bos indicus* (17 a 21 mm de diâmetro; Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997) do que em *Bos taurus* (20 a 30 mm de diâmetro; GINTHER et al., 1989; KASTELIC et al., 1990). Da mesma maneira, há relatos de que a concentração de progesterona produzida pelo CL também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (SEGERSON et al., 1984).

REFERÊNCIAS

ABBAN, G.; JOHNSON, J. Steem cell support of oogenesis in the human. **Human Reproduction**, v.24, p.2974-2978, 2009.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. 2013. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp#>. Acesso em: 20/02/2013.

ADAYEMO, O., HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.14, p.422-420, 1980.

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R. Follicular dynamics in cattle: Historical overview and research update. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.377-396, 2008.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2010.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2011. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em: 20/02/2013.

BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology***,* v.56, p.1483-1496, 2001.

BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., REIS, E.L., NASSER, L.F.T., SILVA, R.C.P., MENEGATTI, J.A., VALENTIN, R., SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae***,* v.31, p.244-245, 2003.

BARUSELLI, P.S., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v.31, n.2, p.205-211, 2007.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B. Manipulação hormonal do estro e da ovulação. In: Curso sobre Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte, v.1, 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004b. 39p.

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

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SÁ FILHO, M.F. Atualização dos protocolos de IATF e TETF. In: 4° Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, v.4, 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2010, p.166-185.

BECKERS, J.F., DRION, P.V., FIGUEIREDO, J.R., GOFFIN, L., PIROTTIN, D., ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.

BEGUM, S., PAPAIOANNOU, V.E., GOSDEN, R.G. **Human Reproduction**, v.10, p.2326-2330, 2008.

BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P., KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility.**, v.38, p.87-98, 1989.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.

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

BONI, R., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C., KOGUT, J., KRUIP THAM. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology,** v.48, p.277-289, 1997.

BRITT, J.H. Impacts of early postpartum metabolism of follicular development and fertility. **Bovine Practice,** v.24, p.39-43, 1991.

BRISTOL-GOULD, S.K., KREEGER, P.K., SELKIRK, C.G., KILEN, S.M., COOK, R.W., KIPP, J.L., SHEA, L.D., MAYO, K.E., WOODRUFF, T.K. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology,** v.298, p.132–148, 2006.

BROER S.L.; MOL, B.W.J.; HENDRIKS, D.; BROEKMANS, F.J.M. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. **Fertility and Sterility**, v.91, n.3, p.705-714, 2009.

BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.

BUKOVSKY, A., SVETLIKOVA, M., CAUDLE, M.R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.17, 2005.

BURNS, D.S., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.

BUTLER, H.W. Ultrastructual studies on mitocondrial swelling. **Journal of Biochemistry.,** v.118, p.883-886, 1970.

BYSKOV, A.G.S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.37, p.277-285, 1974.

BYSKOV, A.G., H∅YER, P.E., YDING ANDERSEN, C., KRISTENSEN, S.G., JESPERSEN, A., M∅LLGARD, K. No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. **Human Reproduction**, v.26, p.2129-2139, 2011.

CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.27-36, 1979.

CANTY, M.J.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O.; CROWE, M.A. Alterations in follicular IGFBP-2, -3 and -4 mRNA expression and intrafollicular IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.199-217, 2006.

CARROL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J., *et al.* Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.321-327, 1990.

CARVALHO, J.B.P., CARVALHO, N.A.T., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. 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.167-175, 2008.

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. Cell 1986; 45:685–698.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA. G,P., BRITO, L.F.C. 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, p.189-96, 2006.

CASTRO NETO, A.S., SANCHES, B.V., BINELLI, M., SENEDA, M.M., PERRI, S.H., GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v.63, p.1249-1255, 2005.

CELIK , O., ESREFOGLU, M., HASCALIK, S., GUL, M., TAGLUK, M.E., ELTER, K., AYDIN, E. use of porcine small intestinal submucosa to reconstruct an ovarian defect. **International Journal of Gynaecology & Obstetrics**, v.106, p.218-222, 2009.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, p.855-865, 2003.

COUTINHO, G.T.R.M.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.; FERREIRA, A.M.; PALHÃO, P.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1089-1096, 2007.

CHRISTIAN, R.E.; CASIDA. L.E. The effects of progesterone in altering the estrous cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v.7, p.540, 1948.

CROWE, M.A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.5, p.20-28, 2008.

CROWE, M.A.; PADMANABHAN, V.; MIHM, M.; BEITINS, I.Z.; ROCHE, J.F. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1445-1450, 1998.

CUERVO-ARANGO, J.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; ALLDECABRES-TORRES, X.; MARTÍNEZ-ROS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A. The effect of a single high dose of PGF2α administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. **Theriogenology**, v.76, p.1736-1743, 2011.

CUMMINS, J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biolology**, v.115, p.23–29, 2004.

DE FELICI, M. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p.632-636, 2010.

DI CLEMENTE, N., GOXE, B., REMY, J.J., CATE, R.L., JOSSO, N., VIGIER, B., SALESSE, R. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. Endocrine 1994; 2:553–558.

DISKIN, M.G. Heat watch: A telemetric system for heat detection in cattle. **The Veterinary Quarterly**, v.30, p.37-48, 2008.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.

DURLINGER, A.L., KRAMER, P., KARELS, B., DE JONG, F.H., UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A., THEMMEN, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, p.5789–5796, 1999.

DURLINGER, A.L., GRUIJTERS, M.J., KRAMER, P., KARELS, B., KUMAR, T.R., MATZUK, M.M., ROSE, U.M., DE JONG, F.H., UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.142, p.4891–4899, 2001.

DURLINGER, A.L., GRUIJTERS, M.J., KRAMER, P., KARELS, B., INGRAHAM, H.A., NACHTIGAL, M.W., UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A., THEMMEN,

A.P. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.143, p.1076–1084, 2002.

EBNER, T., SOMMERGRUBER, M., MOSER, M., SHEBL, O., SCHREIER-LECHNER, E., TEWS, G. Basal level of antimullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. **Human Reproduction**, v.21, p.2022–2026, 2006.

ELDAR-GEVA, T., BEN-CHETRIT, A., SPITZ, I.M., RABINOWITZ, R., MARKOWITZ, E., MIMONI, T., GAL, M., ZYLBER-HARAN, E., MARGALIOTH, E.J. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. **Human Reproduction,** v.20, p.3178–3183, 2005.

ELGINDY, E.A., EL-HAIEG, D.O., EL-SEBAEY, A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. **Fertility and Sterility,** v.89, p.1670–1676, 2008.

EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I.M., WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature,** v.441, p.1109-1114, 2006.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductiveperformance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v.15, p.555-560, 1976.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinolology**, v.4, p.233-254, 1986.

ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology,** v.5, p.1-9, 2003.

FADDY, M., GOSDEN, R. Let's not ignore the statistics. **Biology of Reproduction**, v.81, p.231-232, 2009.

FAIR, T., HULSHOF, C.J., HYTTEL, P., GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology,** v.195, p.327-336, 1997.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ProdSTAT. 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx.htm>. Acesso em: 30/04/2013.

FARNWORTH, P.G. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. **Journal of Endocrinology**, v.145, p.387-395, 1995.

FERGUSON, E.M., LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertilility**, v.116, p.373–378, 1999.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIN, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. p.340.

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

FIKE, K.E.; WEHRMAN, M.E.; LINDSEY, B.R.; BERGFELD, G.; MELVIN, E.J.; QUINTAL, J.A.; ZANELLA, E.L.; KOJIMA, F.N.; KINDER, J.E. Estrus synchronization of beef cattle with a combination of melengestrol acetate and an injection of progesterone and 17b-estradiol. **Journal of Animal Science**, v.77, p.715-723, 1999.

FLEMING, T.P., SAACKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **Journal of Reproduction and Fertilility,** v.29, p.203–212, 1972.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.163-169, 2011.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.465-470, 1996.

GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., MADUREIRA, E.H., TRINCA, L.A., BARROS, C.M., BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.210, 2005 (Resumo).

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; 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 h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079-1093, 1999.

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

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

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** 1st ed. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994.

GRUIJTERS, M.J., VISSER, J.A., DURLINGER, A.L., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular Cell Endocrinology**, v.211, p.85–90, 2003.

GUILBAULT L.A., DUFOURT J.J., THATCHER W.W., DROST M., HAIBEL G.K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.73, p.127-135, 1986.

Hafez B., Hafez E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Manole, São Paulo. 513p, 2004.

HANSENY, P.J. Effects of Environment on Bovine Reproduction. In: YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, W.R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p431-442.

HENAO, G.; OLIVERA-ÁNGEL, M.; MALDONADO-ESTRADA, J.G. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (Bos indicus) cows. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.127-136, 2000.

HENDERSON, K.M., MC NATTY, K.P., SMITH, P., GIBB, M., O'KEEFFE, L.E., LUN, S., HEATH, D.A., PRISK, M.D. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulose cells *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.333-343, 1987.

HENDRIKS, D.J., KWEE, J., MOL, B.W., TE VELDE, E.R., BROEKMANS, F.J. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. **Fertilility and Sterility**, v.87, p.764–775, 2007.

HENDRIKS, D.J., MOL, B.W., BANCSI, L.F., TE VELDE, E.R., BROEKMANS, F.J. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after *in vitro* fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. **Fertility and Sterility**, v.83, p. 291-301, 2005.

HILLIER, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction Update**, v.9, p.188-191, 1994.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v.124, p.43-101, 1991.

HUGHES M.H., GOROSPE W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology***,* v.129, p.2415-2422, 1991.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLENSEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal de 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/html>. Acesso em: 30/04/2013.

IRELAND J.J. Control of Follicular Growth and Development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.39-54, 1987.

IRELAND, J.L.H., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F.,THEMMEN, A.P.N., WARD, F., LONERGAN, P., SMITH, G.W., PEREZ, G.I., EVANS, A.C.O., IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.

IRELAND, J.J., SMITH, G.W., SCHEETZA, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGERA, J.K., IRELAND, J.L.H., MOSSA, F., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.1–14, 2011.

IRELAND, J.J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–1695, 2007.

IRELAND, J.J., ZIELAK, A.E., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J., BETTEGOWDA, A., SCHEETZ, D., WALSH, S., MOSSA, F., KNIGHT, P.G., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.

JORIO A., MARIANA J.C., LAHLOU-KASSI A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.239-250, 1991.

JUENGEL, J.L., SAWYER, H.R., SMITH, P.R., QUIRKE, L.D., HEATH, D.A., LUN, S., WAKEFIELD, S.J., MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.1-10, 2002.

KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, p.1269-1278, 1990.

KWEE, J., SCHATS, R., MCDONNELL, J., THEMMEN, A.P., DE JONG, F.H., LAMBALK, C.B. Evaluation of AMH as test for the prediction of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**, v.90, p.737-743, 2008.

KIM, J.Y., KINOSHITA, M., OHNISHI, M., FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.

KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1424-1440, 1996.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF-{beta} superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, p.191-206, 2006.

LAMB, G.C. Sincronização do estro utilizando CIDR e GnRH. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de Bovinos, Uberlândia, **Anais**, p.215-224, 2004.

LAMB, G.C.; DAHLEN, C.R.; LARSON, J.R.; MARQUEZINI, G.; STEVENSON, J.S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review*.* **Journal of Animal Science**, v.88, p.181-192, 2010.

LARISON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v.38, p. 255-267, 1992.

LEE, M.M., DONAHOE, P.K., HASEGAWA, T., SILVERMAN, B., CRIST, G.B., BEST, S., ET AL. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.81, p.571–576, 1996.

LIU, Y., WU, C., LYU, Q., YANG, D., ALBERTINI, D.F., KEEFE, D.L., LIU, L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. **Developmental Biology**, v.306, p.112-120, 2007.

LUCCI, C.M., SILVA, R.V., CARVALHO, C.A., FIGUEIREDO, R., BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.41, p.61-69, 2001.

LUCY, M.C. The bovine dominant ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, v.85, p.89-99, 2007.

LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates follicles in the ovary of the cow. **Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT,M., MATOS, L.F., WOLF, E., GONÇALVEZ, P.B.D. Variabilidade da punção folicular transvaginal e da produção *in vitro* de embriões em vacas gêmeas monozigóticas. **Acta Scientiae Veterinariae***,* v.31, p.442-443, 2003 (Resumo).

MARTINS JR., A., TAKADA, L., ABRAHÃO, R.G., FREITAS, C.P., CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promisssor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro.* **Acta Scientiae Veterinariae***,* v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).

MACKEY, D.R.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1917-1929, 2000.

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAUJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

MAIO, J.R.H.; SANDOVAL, G.A.F.; SOUZA, E.D.F.; NOGUEIRA, G.P.; CIPRIANO, R.S.; PERECIN, F.; GARCIA, J.M. Concentração sérica de LH em vacas Nelore ciclando ou ovariectomizadas submetidas ao tratamento com 2.0 mg de Benzoato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2006, v.34, p.360 (Resumo).

MARTINEZ, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, v.1, 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2004, p.26-55.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.

MCEVOY, T.G., COULL, G.D., BROADBENT, P.J., HUTCHINSON, J.S., SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertilility,** v.118, p.163–170, 2000.

MCILVEEN, M., SKULL, J.D., LEDGER. W.L. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. **Human Reproduction**, v.22, p.778–785, 2007.

MEMBRIVE, C.M.B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetrıa, em novilhas cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17b estradiol + progesterona.** São Paulo, 2000. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. São Paulo, 2003. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MONNIAUX, D., DI CLEMENTE, N., TOUZÉ, J.L., BELVILLE, C., RICO, C., BONTOUX, M., PICARD, J.Y., FABRE, S. Intrafollicular steroids and anti-Mullerian

hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. **Biology of Reproduction**, v.79, p.387–396, 2008.

MORITA Y., TILLY J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biolology***,* v.213, p.1-17, 1999.

MOUSTAFA, L.A., HAFEZ, E.S. Prenatal development of the bovine reproductive system. **Journal of Reproductive Medicine**, v.7, .3, p.99-113, 1971.

MURDOCH, W.J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society.**, v.71, p.529-543, 1996.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Rewiews**, v.12, p.27-44, 1991.

MUTTUKRISHNA, S., MCGARRIGLE, H., WAKIM, R., KHADUM, I., RANIERI, D.M., SERHAL, P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.112, p.1384–1390, 2005.

MUTTUKRISHNA, S., SUHARJONO, H., MCGARRIGLE, H., SATHANANDAN, M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.111, p.1248–1253, 2004.

NEBEL, R.L.; JOBST, S.M. Evaluation of a systematic breeding programs for lactanting dairy cows: A review. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1169-1174, 1998.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Celular Endocrinology**, v.175, p.123-30, 2001.

NILSSON, E., KEZELE, P., SKINNER, M.K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Celular Endocrinology**, v.188, p.65-73, 2002.

NOGUEIRA, G. P. Puberdade e Maturidade Sexual de Novilhas Bos Indicus. In: 2° Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, v.1, 2006, Londrina. Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2006, p.180-190.

NUNEZ, Q.M. Morfologia del tracto genital de los pequeños ruminantes. **Revista Científica**, v.3, p.77-86, 1993.

PACCHIAROTTI, J., MAKI, C., RAMOS, T., MARH, J., HOWERTON, K., WONG, J., PHAM, J., ANORVE, S., CHOW, Y.C., IZADYAR, F. differentiation potential of germ cells derived from the postnatal mouse ovary. **Differentiation,** v.79, p.159-170, 2010.

PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4262-71, 1999.

PARTE, S., BHARTIYA, D., TELANG, J., DAITHANKAR, V., SALVI, V., ZAVERI, K., HINDUJA, I. Detection, characterization, and spontaneous differentiation *in vitro* of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. **Stem Cells Development**, v.20, p.1451-1464, 2010.

PENARRUBIA, J., FABREGUES, F., MANAU, D., CREUS, M., CASALS, G., CASAMITJANA, R., CARMONA, F., VANRELL, J.A., BALASCH, J. Basal and stimulation day 5 anti- Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist: gonadotropin treatment. **Human Reproduction,** v.20, p.915–922, 2005.

PEREA, F.P.; DE ONDIZ, A.D.; PALOMARES, R.A.; HERNÁNDEZ, H.J.; GONZÁLEZ, R.; SOTO, E.R. Control of postpartum anestrous with an intra-vaginal progesterone device plus eCG or calf removal for 120 h in suckled crossbred cows managed in a pasture-based system. **Animal Reproduction Science**, v.106, ¾, p.298-310, 2008.

PETERSON, C.A.; HUHN, J.C.; KESLER, D.J. Norgestomet- and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.253-259, 2000.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.16, p.271-278, 1976.

PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrionology and Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia. 1989. p.303-354.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PONTES, J.H.F., SILVA, K.C.F., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P.H.S., FAIFER, F.S., STERZA, F.A.M., SCHENK, J.L., SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Sinchonization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-923, 1995.

QUINTANS, G.; VIÑOLES, C.; SINCLAIR, K.D. Follicular growth and ovulation in postpartum beef cows following calf removal and GnRH treatment. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.5-14, 2004.

RAE, D.O., CHENOWETH, P.J., GIANGRECO, M.A., DIXON, P.W., BENNET, F.L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, p.1121-1132, 1999.

RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W**.** Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-277, 1995.

RHODES, F.M.; MCDOUGALL, S.; BURKE, C.R.; VERKERK, G.A.; MACMILLAN, K.L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1876-1894, 2003.

RIEGER, D., LOSKUTOFF, N. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertilility**, v.100, p.257–262, 1994.

RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v.144, p.2977-2987, 2003.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis - A symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.19-27, 1996.

RODGERS, R.J., LAVRANOS, T.C., VAN WEZEL, I.L., IRVING-RODGERS, H.F. Development of the ovarian follicular epithelium. **Molecullar and Cellular Endocrinology**, v.151, p.171-179, 1999.

ROY, S.K., TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v.59, p.783-790, 1993.

RUBIN, K.C.P., RIGO, A.G., SCHROEDER, R.V., SILVA, R.C.P, MARQUES, M.O., SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004 (Resumo).

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., NONATO JR., ERENO JR, J.C., PANSARD, H., SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Resumo).

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

SÁ FILHO, M.F.; AMARAL, J.P.B.; MANTOVANI, A.P.; REIS, E.L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Effect of synthetic progesterone (Afisterone®) administration at the moment of CIDR® insertion on follicular wave emergence in beef heifers. In: International Congress on Animal Reproduction, v.1, 2004, Porto Seguro. **Proceedings…** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p.127.

SÁ FILHO, M.F.; BALDRIGHI, J.M.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.132-139, 2011.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILHO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence

likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.23-30, 2010.

SALES, J.N.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R.W.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.12-18, 2011.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P.; GIROTTO, R.W.; MAIO, J.R.G.; RODRIGUES, M.P.; CARVALHO, C.A.B.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. 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**, 2008, v.36, p.486 (Resumo).

SALES, J.N.S.; CRESPALDI, G.A.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, E.F.D.; CARREIROS, S.S.; VERONEZ, D.G.; BARUSELLI, P.S. Perfil de liberação de LH após tratamento com cipionato de estradiol em novilhas Nelore ovariectomizadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2007, v.35, p.1028 (Resumo).

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (Bos indicus) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chéz les ruminats. **Recueil Veterinaire de Medicina**, v.167, p.205-218, 1991.

SAVIO, J.D.; TATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.197-203, 1993.

SANTOS, R.G., SOTO, M.A.B., LOURENÇO, R.X., STRANIERI, P., BISHOP, W., ACCORSI, M.F., WATANABE, M.R., DAYAN, A., WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. **Anais...**, p.79, 2005 (Resumo).

SAUMANDE J. La Folliculogenèse Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38, 1981.

SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertilility**, v.83, p.663-671, 1988.

SEGERSON, E.C., HANSEN, T.R., LIBBY, D.W., RANDEL, R.D., GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science***,* v.59, p.1026-1046, 1984.

SENEDA, M.M., GODMANN, M., MURPHY, B.D., KIMMINS, S., BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. **Reproduction**, v.135, p.829-838, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G, SILOTO, L.S., MOROTTI, F., MARCANTONIO, T.N., SENEDA, M.M. Comparação entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) e 1/2 Nelore x Angus (1/2 *Bos indicus* x *Bos taurus*). **Acta Scientiae Veterinariae,** v.40, p.345, 2012 (abstract).

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction***,* v.39, p.308-317, 1988.

SILVA, A.R.R.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA FILHO, B.D. Estudo da dinâmica folicular em novilhas da raça Gir através de ultra-sonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.130-132, 2001.

SILVA, K.C.F. **Estudo comparativo da recuperação de complexo *cumulus* oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.** 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; ROVANI, M.T.; FERREIRA, R.; BORGES, L.F.; GONÇALVES, P.B. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.614-619, 2009.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160, 2005.

SOUMANO, K.; SILVERSIDES, D.W.; DOIZÉ, F.; PRINCE, C.A. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1419-1426, 1996.

SMEENK, J.M., SWEEP, F.C., ZIELHUIS, G.A., KREMER, J.A., THOMAS, C.M., BRAAT, D.D. Antimullerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracyoplasmic sperm injection. **Fertilility and Sterility,** v.87, p.223–226, 2007.

SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozogous carriers or non-carriers of the FecB gene. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.41-54, 1994.

STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotrophin, and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v.59, p.777-783, 1998.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.527-536, 1981.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth and the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, p.1108-1114, 1993.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160, 2005.

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.547-555, 1994.

TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777–782, 2001.

TAKAHASHI, M., HAYASHI, M., MANGANARO, T.F., DONAHOE, P.K. The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction,** v.35, p.447–453, 1986.

TARAZONA, A.M., RODRIGUEZ, J.I., RESTREPO, L.F., OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.5–11, 2006.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-19, 2004.

TILLY J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction,** v.1, p.162-172, 1996.

ULBERG, L.C.; LINDLEY, C.E. Use of progesterone and estrogen in the control of reproductive activities in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.19, p.1132-1142, 1960.

VAILES, L.D.; WASHBURN, S.P.; BRITT, J.H. Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v.70, p.2094-2103, 1992.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E.E.; BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v.6, p.457-474, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VAN ROOIJ, I.A., BROEKMANS, F.J., TE VELDE, E.R., FAUSER, B.C., BANCSI, L.F., DE JONG, F.H., THEMMEN, A.P. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction,** v.17, p.3065–3071, 2002.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A**.** Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira***,* v.35, p.2501-2509, 2000.

VIGIER, B., PICARD, J.Y., TRAN, D., LEGEAI, L., JOSSO, N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v.114, p.1315–1320, 1984.

VISSER, J.A., DE JONG, F.H., LAVEN, J.S., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, v.131 p.1–9, 2006.

VISSER, J.A., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. **Molecular Cell Endocrinology**, v.234, p.81–86, 2005.

VIRANT-KLUN, I., SKUTELLA, T. Stem cells in aged mammalian ovaries. **Aging**, v.2, p.3-6, 2010.

VIRANT-KLUN, I., STIMPFEL, M., SKUTELLA, T. **Histolology and Histopathology**, v.26, p.1071-1082, 2011.

VITT, U.A., MCGEE, E.A., HAYASHI, M., HSUCH, A.J. In vivo treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v.141, p.3814-20, 2000.

WATANABE, M.R., WATANABE, Y.F., FRANCESCHINI, P.H., DAYAN, A., LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.438, 1999.

WANDJI, S.A., EPPIG, J.J., FORTUNE, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology,** v.45, p.817-832, 1996.

WHITE, Y.A.R., WOODS, D.C., TAKAI, Y., ISHIHARA, O., SEKI, H., TILLY, J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nature Medicine**, v.18, p.413–421, 2012. doi:10.1038/nm.2669

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.

WILLIAMS, G.L.; GAZAL, O.S.; GUZMÁN VEGA, G.A.; STANKO, R.L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.289-297, 1996.

WILTBANK, M.C.; HAUGHIAN, J.M. GnRH: Bases fisiológicas para entender sua utilização em protocolos de sincronização. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, v.1, 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., 2003, p.121-131.

WOLFENSON, D., INBARA, G., ROTHA, Z., KAIMB, M., BLOCHA, 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.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.

ZHANG, P., LV, L.X., XING, W.J. Early meiotic-specific protein expression in post-natal rat ovaries. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.447-453, 2010.

ZOU, K., YUAN, Z., YANG, Z., LUO, H., SUN, K., ZHOU, L., XIANG, J., SHI, L., YU, Q., ZHANG, Y., HOU, R., WU, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nature Cell Biology,** v.11, p.631-636, 2009.

ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary**. Recent Progress in Hormone Research**, v.6, p.63-108, 1951.

3 HIPÓTESE

Vacas Nelore com alto número de folículos antrais apresentam maiores taxas de concepção à IATF e produção *in vitro* de embriões, quando comparadas com vacas Nelore com intermediário e baixo número de folículos antrais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a taxa de concepção e a produção *in vitro* de embriões de fêmeas Nelore com alto, intermediário e baixo número de folículos antrais presentes nos ovários.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a taxa de concepção à IATF entre fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus)* com alta, intermediária e baixa contagem de folículos presentes nos ovários;
- Comparar a produção *in vitro* de embriões entre fêmeas bovinas da raça Nelore *(Bos indicus)* com alta, intermediária e baixa produção de oócitos.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1 – EFEITO DO NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIS SOBRE TRAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS NELORE SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE IATF

Gustavo Martins Gomes Dos Santos[1]; Katia Cristina Silva-Santos[1]; Thales Ricardo Rigo Barreiros[2]; Wanessa Blaschi[2]; Fábio Morotti[1]; Fábio Lucas Zito de Moraes[1]; Marcelo Marcondes Seneda[1*]

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da população de folículos antrais sobre a taxa de concepção de vacas Nelore com alta, intermediária e baixa contagem de folículos antrais presentes nos ovários. Vacas de corte Nelore (*Bos indicus,* n = 701), multíparas, com 45±15 dias de pós parto e com ECC de 3,0 ± 0,5 (escala 1-5) foram submetidas a protocolo de sincronização da ovulação. Em dias aleatórios do ciclo estral (D0), as vacas receberam dispositivo intravaginal (CIDR®, Zoetis, Brasil) e 2mg BE (Estrogin®, Farmavet, Brasil), IM. Na retirada do implante (D8), receberam 0,51mg PGF2α (Ciosin®, Intervet-Schering Plough, Brasil), 300UI eCG (Novormon®, Syntex SA, Argentina) e 1mg CE (ECP®, Pfizer, Brasil), IM. As vacas foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 48h a 52h após a retirada do dispositivo de P4. Folículos antrais ≥ 3 mm foram contados por ultrassonografia, utilizando transdutor intravaginal microconvexo (D0), e as vacas foram divididas em grupos de alta contagem de folículos antrais (CFA; G-Alta, ≥25 folículos, n = 149), intermediária CFA (G-Intermediário, 11-24 folículos, n = 400) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤10 folículos, n = 152). O número de folículos foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis e as taxas de concepção foram comparadas por Qui-quadrado ($p \leq 0,05$). O número médio de folículos antrais (média ± DP) foi 17,93 ± 8,45 e a taxa de concepção média 51,49% (361/701). A população folicular média foi 30,70 ± 5,66 (G-Alta), 17,03 ± 3,28 (G-Intermediário) e 7,83 ± 2,42 folículos (G-Baixa, $p<0,05$). Não houve diferença na taxa de concepção entre os grupos de alta e baixa CFA (51,67 versus 60,50%), porém, a taxa de concepção do grupo de baixa CFA foi maior comparado ao grupo de intermediário CFA (60,50 versus 48,00%, $p<0,05$). Dessa forma, conclui-se que vacas Nelore com baixa CFA apresentaram taxa de concepção à IATF superior comparado a vacas com intermediária CFA.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais. Taxa de concepção. IATF. Nelore.

[1] Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, 86051-990 Brasil.

[2] Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual do Norte do Paraná (Uenp), Bandeirantes, PR, Brasil

Introducão

Nos últimos anos, alguns estudos relataram alta variabilidade no número de folículos pré-antrais e antrais entre bovinos (ERICKSON, 1966; BURNS et al, 2005; SILVA-SANTOS et al, 2011; SILVA-SANTOS, 2013). No entanto, o número de folículos antrais ≥ 3 mm de diâmetro é altamente repetível (0,85 a 0,95) no mesmo indivíduo durante as ondas de crescimento folicular (BURNS et al, 2005;. IRELAND et al, 2007; MOSSA et al., 2012; SILVA–SANTOS, 2013). Desta maneira, com o auxílio da ultrassonografia, é possível identificar fêmeas com baixo, intermediário ou alto número de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular.

Estudos vêm mostrando que vacas leiteiras com baixa contagem de folículos antrais (CFA) apresentam características usualmente associadas com infertilidade, tais como ovários menores, redução da reserva folicular ovariana, menor responsividade à superovulação e menor quantidade de embriões transferíveis, menor quantidade de hormônio anti-Mülleriano (AMH) e concentração de progesterona durante o ciclo estral, menor espessura endometrial, maior secreção de FSH e maior quantidade de marcadores de células do *cumulus* indicativos de menor qualidade do oócito (SINGH et al., 2004; IRELAND et al., 2007; EVANS et al., 2010; IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012). Estes resultados fornecem evidências indiretas para uma associação entre baixa fertilidade e baixa CFA.

Apesar destas observações, são escassos os trabalhos que relatam a influência da CFA sobre a taxa de concepção à IATF de vacas de corte da raça Nelore. O objetivo deste trabalho foi determinar se a taxa de concepção à IATF de vacas de corte da raça Nelore (*Bos indicus*) é influenciada pela CFA.

Material e Métodos

Animais

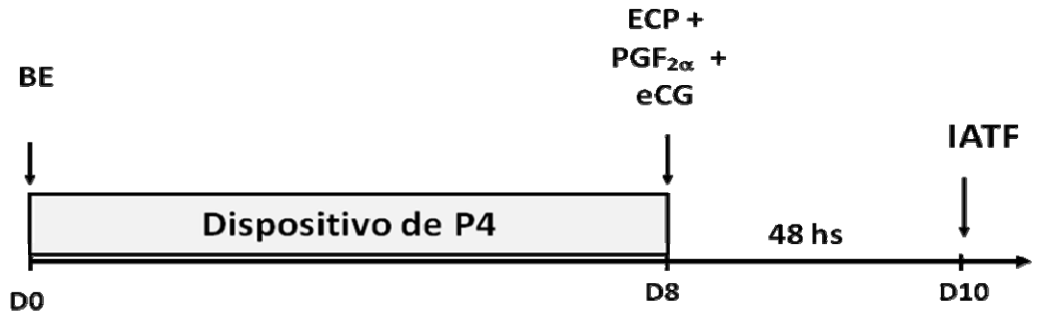
Vacas Nelore (*Bos indicus,* n = 701) multíparas, com idade média de 72 ± 12 meses, com 45±15 dias de pós-parto e com ECC de 3,0 ± 0,5 (escala 1-5; LOWMAN et al., 1976), mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* e mistura

mineral *ad libitum,* foram submetidas à protocolo hormonal de sincronização da ovulação.

Protocolo hormonal

Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal 1,9g (CIDR®, Zoetis, Brasil) e 2mg BE (Estrogin®, Farmavet, Brasil), IM. Na retirada do implante (D8), receberam 500µg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Intervet-Schering Plough, Brasil), 300UI eCG (Novormon®, Syntex SA, Argentina) e 1mg CE (ECP®, Pfizer, Brasil), IM. As vacas foram inseminadas em tempo fixo (IATF), 48-52 h após a retirada do dispositivo de P4 (Figura 1). O diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado 30 dias após a IATF.

Figura 1 – Protocolo hormonal de sincronização da ovulação utilizado em vacas de corte Nelore com alta CFA (G-Alta, ≥ 25 folículos), intermediária CFA (G-Intermediário, 11-24 folículos) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤ 10 folículos).



Contagem de folículos antrais

No dia da colocação do dispositivo de progesterona (D0), os ovários de cada animal foram avaliados com transdutor intravaginal microconvexo de 7,5 MHz (Aquila PRO, Pie medical, Maastricht, Holanda) e os folículos antrais foram contados, como descrito previamente (BURNS, et al, 2005, IRELAND et al, 2008, SILVA-SANTOS, 2013). Cada ovário foi em sua totalidade avaliado pelo ultrassom para identificar as posições dos folículos antrais ≥ 3 mm. A contagem de folículos antrais (CFA - número total de folículos antrais ≥ 3 mm de diâmetro) por par de ovários foi determinada para cada animal. Depois das avaliações ultrassonográficas, as fêmeas foram divididas em três grupos, de acordo com o número de folículos

antrais ≥ 3mm, conforme segue: fêmeas com alta CFA (G-Alta, ≥ 25 folículos, n = 149), intermediária CFA (G-Intermediário, 11-24 folículos, n = 400) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤ 10 folículos, n = 152).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias ± DP. A análise estatística foi realizada usando o software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007). O número de folículos foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis e as taxas de concepção foram comparadas por Qui-quadrado. Para todas as análises, $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

O número médio de folículos antrais (média ± DP) foi 17,9 ± 8,5 (variação de 2 a 50 folículos) e a taxa de concepção média foi 51,5% (361/701). A frequência de distribuição das vacas conforme a população folicular pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 – Frequência de distribuição de vacas de corte Nelore com diferentes populações foliculares e submetidas a protocolo hormonal de sincronização da ovulação.

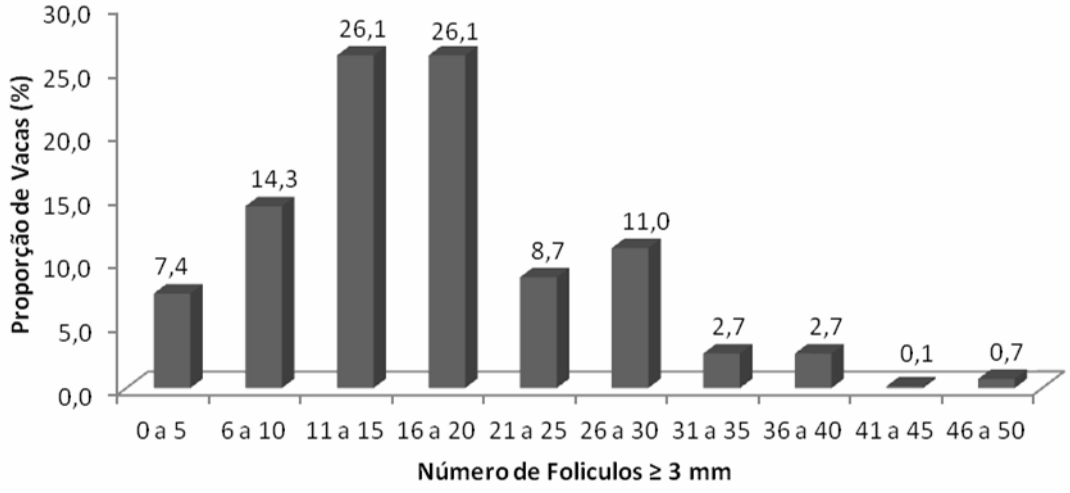


Tabela 1 – População folicular média (± DP) e taxa de concepção à IATF de vacas de corte Nelore com alta CFA (G-Alta, ≥ 25 folículos), intermediária CFA (G-Intermediário, 11-24 folículos) ou baixa CFA (G-Baixa, ≤ 10 folículos).

	n	CFA	Taxa de Concepção (%)
G- Baixa	152	7,8 ± 2,4[c]	60,5 (92/152)[a]
G- Intermediário	400	17,0 ± 3,3[b]	48,0 (192/400)[b]
G- Alta	149	30,7 ± 5,7[a]	51,7 (77/149)[ab]
Total	701	17,9 ± 8,5	51,5% (361/701)

Valores na mesma coluna diferem a 5% de probabilidade

Discussão

Estudos anteriores mostram que bovinos leiteiros com relativamente baixa CFA (<15 folículos) possuem diversas características fenotípicas geralmente associadas com redução de fertilidade (IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012). Neste trabalho, diferentemente do que já foi relatado para vacas de leite, não observamos influência positiva da CFA sobre a taxa de concepção à IATF de vacas de corte Nelore.

Nos últimos anos, foi relatado que vacas de leite com baixa CFA apresentam secreção aumentada de FSH, diminuição da produção de progesterona (EVANS et al, 2010, IRELAND et al., 2011), ovários menores (IRELAND et al., 2008), reduzida espessura endometrial (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009) e reduzida resposta superovulatória (SINGH et al, 2004; IRELAND et al., 2007; SILVA-SANTOS, 2013) em comparação a bovinos da mesma idade com alta CFA. Em nosso estudo, não observamos diferença entre a taxa de concepção à IATF de vacas com baixa e alta CFA (60,5% vs 51,7%; p=0,08). Entretanto, observamos taxa de concepção superior para vacas com baixa CFA comparado as de intermediária CFA (60,5% vs 48,0%; p<0,05). Esta menor taxa de concepção para as vacas do grupo com intermediária CFA deve ser considerada, visto que as vacas deste grupo representaram mais de 50% da população experimental (Figura 2). Outros autores também já relataram que a população que apresenta intermediária CFA representa mais que 50% das vacas (MOSSA et al., 2012).

Trabalho recente demonstrou não existir influência da CFA sobre a taxa de concepção à IATF (29,27 vs 29,33 vs 29,34; P>0.05) para vacas de alta (CFA ≥53), intermediária (CFA entre 34 e 53) e baixa CFA (CFA ≤34), respectivamente (RODRIGUES, 2013). Vale ressaltar que estes autores adotaram

pontos de corte, para as divisões dos grupos, bem superiores aos utilizados em nosso trabalho. Além disso, a taxa de concepção relatada (~29%) foi inferior à média nacional (~ 50%), observada na maior parte dos trabalhos (BARUSELLI et al., 2012; SALES et al., 2012; SÁ FILHO et al., 2013).

Recentemente, foi demonstrado que vacas Holstein-Friesian, *bos taurus,* com aptidão leiteira apresentaram menores taxas de concepção ao primeiro serviço (32% *vs* 38% - IA convencional), menor taxa de prenhez ao final da estação de monta (84% *vs* 94%) e maior intervalo parto-concepção (114 *vs* 100 dias) para vacas de baixa CFA (<15 folículos) comparado a vacas com alta CFA (> 25 folículos; MOSSA et al., 2012), respectivamente. Martinez et al. (2013), trabalhando com vacas taurinas da raça Holandesa e Jersey, relataram que vacas com baixa CFA (< 20 folículos) apresentaram menor taxa de concepção a primeira IA (45,2 *vs* 66,5%; p<0,02) e menor taxa de parição (64 *vs* 79,9%; p<0,02), comparadas a vacas de alta CFA (> 30 folículos). Vale ressaltar que estes trabalhos foram realizados com IA convencional/ observação de cio, diferente do nosso trabalho onde as vacas foram submetidas a protocolo hormonal para a sincronização da ovulação/ IATF.

Nosso trabalho apresenta novos dados de correlação de CFA com fertilidade, porém, pela primeira vez para vacas de corte Nelore (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de IATF. Já os trabalhos anteriores utilizaram vacas com aptidão leitera, Holstein-Friesian e/ou Jersey (*Bos taurus).* Diferenças marcantes vêm sendo relatadas entre estas duas subespécies. Fêmeas *indicus* apresentam estro de duração mais curta (MIZUTA, 2003) e geralmente no período noturno (PINHEIRO et al., 1998). Em relação ao número de ondas foliculares, fêmeas da raça Holandesa apresentam predominância de duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004), enquanto em fêmeas *indicus* há maior incidência de três ondas (VIANA et al., 2000). Um dos aspectos de maior contraste entre fêmeas *indicus* e *taurus* refere-se ao número de folículos recrutados por onda, sendo este em média quatro vezes maior nas zebuínas (CARVALHO et al., 2008; PONTES et al., 2011).

Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e a divergência folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (ADAYEMO; HEATH, 1980; SARTORELLI et al., 2005). Vacas taurinas apresentam maior diâmetro do folículo dominante (FIGUEIREDO et al., 1997), maior diâmetro de corpo lúteo (GINTHER et

al., 1989; KASTELIC et al., 1990; RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997), e maior concentração de progesterona produzida pelo CL (SEGERSON et al., 1984). Existem também diferenças marcantes entre a concentração de AMH circulantes entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus.*

Em trabalho recente, nosso grupo, avaliando a dinâmica folicular de novilhas de corte Braford com alta e baixa CFA, submetidas a protocolo de sincronização da ovulação (IATF), observou diferença no diâmetro do folículo ovulatório (1,15±0,2 vs 1,32±0,2 cm; P<0,05) e tendência de maior diâmetro do CL, 7 dias depois da IATF (1,93±0,3 vs 2,04±0,3 cm; p=0,09) entre fêmeas de alta e baixa CFA, respectivamente (SANTOS el al., 2012). Já está bem estabelecido que folículos ovulatórios maiores, originam CL maiores e que por sua vez, produzem maiores secreções séricas de P4 (BINELLI, et al., 2001; MUSSARD et al. 2003). Este fator é determinante na manutenção da gestação, tendo em vista a função de promover ambiente favorável à capacidade do embrião em se alongar e secretar interferon-tau, bloqueando os mecanismos luteolíticos (MANN et al., 1995; CLEMENTE et al., 2009).

Desta maneira, podemos concluir que a população de folículos antrais ovarianos de fêmeas de corte da raça Nelore não apresentou influência positiva sobre a taxa de concepção à IATF, visto que vacas com alta ou baixa CFA apresentaram taxas de concepção semelhantes. Entretanto, vacas de corte Nelore com baixa CFA apresentaram taxa de concepção à IATF superior a de vacas com intermediária CFA.

Referências

ADAYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.14, p.422-420, 1980.

AYRES, M.; AYRES JR.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. 2007. BioEstat 5.0. Statistical applications in biological and medical sciences. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 59pp.

BARUSELLI, P.S. ; SALES, J.N.S. ; SALA, R.V. ; VIEIRA, L.M. ; SÁ FILHO, Manoel Francisco de . History evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. Animal Reproduction, v. 9, p. 139-152, 2012.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology,** Philadelphia, PA, v. 56, n. 9, p. 1451-63, 2001.

BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L., NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. 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.167-175, 2008.

CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D,; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproducion,** Southampton, UK, v. 138, n. 3, p. 507-17, 2009.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

EVANS, A. C.; F. MOSSA, T.; FAIR, P.; LONERGAN, S. T.; BUTLER, A. E.; ZIELAK-STECIWKO, G. W.; SMITH, F.; JIMENEZ-KRASSEL, J. K.; FOLGER, J. L. IRELAND, J. J. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. Pages 421-429 in Reproduction in Domestic Ruminants VII. M. C. Lucy, J. L.; Pate, M. F.; Smith T. E. Spencer, eds. Soc. **Reproduction. Fertility**, Vol. 67. 2010.

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

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

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.;THEMMEN, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZA, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGERA, J.K.; IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.1–14, 2011.

IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.,; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–1695, 2007.

JIMENEZ-KRASSEL, F. J. K., FOLGER, J. L. IRELAND, G. W. SMITH, X. HOU, J. S. DAVIS, P. LONERGAN, A. C. EVANS, J. J. IRELAND. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy Young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. Biol. Reprod. 80:1272–1281, 2009.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, p.1269-1278, 1990.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; FRAY, M. D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. Animal Reproduction Science, v. 37, p. 121 – 131, 1995.

MARTINEZ, M.F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L.; LAWRENCE, S.; BRYANT, A.; SARA, E.; JUENGEL, J. Antral follicular count (AFC) and fertility in new zealand dairy cows. SSR 46th Anual Meeting. **Abstracts.** p. 23. 2013.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. São Paulo, 2003. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOSSA, F., S. W. WALSH, S. T. BUTLER, D. P. BERRY, F. CARTER, P. LONERGAN, G. W. SMITH, J. J. IRELAND, AND A. C. EVANS. Low numbers of ovarian follicles ≥3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 2012.

MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; GASSER, C. L.; BEHLKE, E. J.; COLLIFLOWER, K. A.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Ovulatory response, luteal function and fertilityin cattleinduced to ovulate dominance follicles of early or late maturity. **Biology Reproduction**, v. 68: (Supplement 1), p. 332 (Abstract 535), 2003.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PONTES, J.H.F., MELO-STERZA, F.A., BASSO, A.C., FERREIRA, C.R., SANCHES, B.V., RUBIN, K.C.P., SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.

RODRIGUES, A.S., **Contagem de foliculos antrais em fêmeas Nelore submetidas a um protocol de IATF.** Salvador, 2013. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador. 2013.

RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W**.** Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-277, 1995.

SÁ FILHO, MANOEL F., PENTEADO, L., REIS, E.L., REIS, T. A.N.P.S., GALVÃO, K.N., BARUSELLI, P.S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. Theriogenology, v. 79, p. 625-632, 2013.

SALES, J.N.S., CARVALHO, J.B.P., CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S., JACOMINI, J.O., MAIO, J.R.G., SOUZA, J.C., NOGUEIRA, G.P.,BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. Theriogenology, p. 1-10, 2012.

SANTOS, G. M. G. S.; SANTOS, K. C. S.; SILOTO, L. S.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T. N.; THASMO, R. L. O.; JÚNIOR KOETZ, C.; LIMA, D. C. M.; BELOTTO, A. F.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dinamycs in bovine females with high, medium and low antral follicular counts: preliminary results. **Animal Reproduction**. v. 9, p. 463, 2012.

SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J., BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SEGERSON, E.C., HANSEN, T.R., LIBBY, D.W., RANDEL, R.D., GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science***,* v.59, p.1026-1046, 1984.

SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.

SILVA-SANTOS, Katia Cristina. **Comparação da produção de embrião, população de folículos pré-antrais ovariana e do teor de lipídios nos oócitos entre fêmeas bovinas com alta e baixa contagem de folículos antrais**. 2013. 151f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SINGH, J., DOMINGUEZ, M., JAISWAL, R., ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227–243, 2004.

STARBUCK-CLEMMER, M. J.; HERNANDEZ-FONSECA, H.; AHMAD, N.; SEIDEL, G.; INSKEE, E. K. Association of Fertility with Numbers of Antral Follicles Within a

Follicular Wave During the Oestrous Cycle in Beef Cattle. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 42, p. 337–342, 2007.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A**.** Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira***,* v.35, p.2501-2509, 2000.

WOLFENSON, D., INBARA, G., ROTHA, Z., KAIMB, M., BLOCHA, 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.

ARTIGO 2 – VACAS NELORE COM ALTA PRODUÇÃO DE OÓCITOS APRESENTAM MAIOR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES QUANDO SUBMETIDAS À PROGRAMA DE OPU / PIVE

Gustavo Martins Gomes Dos Santos[3]; Katia Cristina Silva-Santos[1]; Bruno Valente Sanches[1]; Marcelo Marcondes Seneda[1*]

Resumo: Objetivou-se comparar a produção de embriões entre fêmeas bovinas com alta, intermediária e baixa quantidade de oócitos obtidos por OPU. Fêmeas Nelore (*Bos indicus*, n = 66, 72-96 meses) foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia com transdutor intravaginal microconvexo (7,5 MHz). Imediatamente após a recuperação, COCs foram classificados e transportados até o laboratório para PIVE. A FIV foi realizada com sêmen convencional de um único touro previamente testado. As fêmeas foram divididas em grupos, conforme a produção de oócitos totais: G-Alta (n = 22, ≥40 oócitos), G- Intermediária (n = 25, 18-25 oócitos) e G-Baixa (n = 19, ≤7 oócitos). Os dados foram avaliados pelo teste de Qui-Quadrado (p≤0,05). O número médio de COCs recuperados foi 50,4±11,3 (G-Alta), 21,4±3,0 (G-Intermediária) e 5,3±1,5 (G-Baixa, p<0,05). O número médio de oócitos viáveis foi 40,4±10,6 (G-Alta), 14,8± 3,0 (G-Intermediária) e 3,8±1,1 (G-Baixa, p<0,05) e a porcentagem de oócitos viáveis foi 80% (888/1109, G-Alta), 69% (371/534, G-Intermediária) e 71% (72/101, G-Baixa, p<0,05). A taxa de clivagem foi 79% (762/965, G-Alta), 74% (348/472, G-Intermediária) e 71% (65/92, G-Baixa, p<0,05) e a taxa de blastocisto foi 42% (405/965, G-Alta), 32% (153/472, G-Intermediária) e 13% (12/92, G-Baixa, p<0,05). O número médio de embriões viáveis foi 18,4±6,7 (G-Alta), 6,1±3,6 (G-Intermediária) e 0,6±0,7 (G-Baixa, p<0,05) e a porcentagem de embriões vitrificáveis foi 81% (329/405, G-Alta), 77% (118/153, G-Intermediária) e 58% (7/12, G-Baixa, p<0,05). Conclui-se que vacas Nelore com alta produção de oócitos apresentaram maior porcentagem de oócitos viáveis, taxa de clivagem e blastocisto e porcentagem de embriões vitrificáveis comparado às de baixa, após procedimento de OPU/PIVE. As vacas do G-Alta apresentaram ~10 vezes maior produção de oócitos e produziram ~30 vezes mais embriões viáveis em relação as de baixa.

Palavras-chave: Produção de oócitos. PIVE. Bovinos.

Introducão

Considerando a importância da produção de embriões para o melhoramento genético, é importante ressaltar a grande variabilidade na produção de embriões por doadora após procedimento de aspiração folicular (OPU) / produção *in vitro* de embriões (PIVE; PONTES et al., 2009). Para os embriões produzidos *in*

[3] Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, 86051-990 Brazil

* *e-mail:* mseneda@uel.br

vitro, já foi relatado que a variação no número de oócitos recuperados influencia o número final de embriões produzidos (PONTES et al., 2011). Nos últimos anos, alguns estudos relatam alta variabilidade no número de folículos pré-antrais e antrais entre bovinos (ERICKSON, 1966; BURNS et al, 2005; SILVA-SANTOS et al, 2011, SILVA-SANTOS, 2013). No entanto, o número de folículos antrais ≥ 3 mm de diâmetro é altamente repetível no mesmo indivíduo (0,85 a 0,95) durante as ondas de crescimento folicular (IRELAND et al, 2007.; MOSSA et al., 2012; SILVA-SANTOS, 2013). Portanto, é possível identificar com o auxilio da ultrassonografia, fêmeas com baixa, intermediária ou elevada quantidade de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular.

Estudos anteriores mostram que vacas de leite com baixa contagem de foliculos antrais (CFA; <15 foiculos antrais) possuem características fenotípicas associadas com redução de fertilidade (IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi determinar se a quantidade de oócitos recuperados após OPU influencia a taxa de clivagem e de blastocisto de vacas de corte da raça Nelore (*Bos indicus*), quando submetidas a programas de OPU / PIVE.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizadas 66 vacas de corte da raça Nelore (*Bos indicus*) com idade média de 84 ± 12 meses, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* e suplementadas com mistura mineral *ad libitum*. As fêmeas apresentavam escore de condição corporal médio de 3,5 ± 0,5 (escala de 1 a 5; LOWMAN et al, 1976.) e peso vivo médio de 480 ± 20 kg.

Preparação da doadoras

Antes de cada procedimento, as fezes foram removidas do reto e a área perineal foi lavada com água e limpa com etanol 70%. Antes da OPU, cada vaca recebeu anestesia epidural (4 ml de lidocaína a 2%; anestésico L, Pearson, São Paulo, SP, Brasil) para redução do peristaltismo e desconforto.

Aspiração Folicular e Separação dos Grupos

Procedimentos previamente descritos foram utilizados para a aspiração folicular (Seneda et al., 2001). Cada folículo visível foi aspirado utilizando-se transdutor microconvexo de 7,5 MHz (Aquila PRO, Pie médico, Maastricht, Holanda) montado em um guia de aço inoxidável (Pie Medical). A punção folicular foi realizada usando agulha hipodérmica descartável 40x8 mm (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil), ligada a um tubo cônico de 50 mL (Corning, Acton, MA, EUA) através de equipos de silicone (0,8 m, 2 mm de diâmetro). A aspiração do material foi realizada utilizando bomba de vácuo (WTA, Watanabe, Brasil) com pressão negativa de 75 mm Hg. O meio de coleta foi a solução tampão fosfato (PBS-Nutricell, Campinas, SP, Brasil), com 10.000 UI / L de heparina sódica (Sigma H-3149).

Os COC's recuperados foram classificados e transportados para o laboratório para a PIVE (PONTES et al., 2011). A FIV foi realizada com sêmen de um único touro Nelore de fertilidade conhecida. As fêmeas foram separadas em grupos, de acordo com a produção de oócitos, conforme segue: G-Alta (n = 22, ≥ 40 oócitos), G-Intermediária (n = 25, 18-25 oócitos) e G-Baixa (n = 19, ≤ 7 oócitos).

Produção in vitro de embriões

Imediatamente após a recuperação, o material aspirado foi lavado e filtrado em filtro 70 micras (Immuno Systems Inc., Spring Valley, WI, EUA) com solução tampão de fosfato (PBS-Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) foram classificados de acordo com a presença de células do *cumulus* e a qualidade do oócito, utilizando os seguintes critérios: 1) Bom, mais de três camadas de células do *cumulus*, 2) regular, pelo menos uma camada de células do *cumulus*, 3) desnudos e 4) atrésicos, com *cumulus* escuro e sinais de degeneração do citoplasma (SENEDA et al., 2001). Oócitos bons e regulares foram considerados viáveis e foram utilizados, enquanto os oócitos atrésicos foram descartados. Antes da maturação *in vitro* (MIV), os COCs foram lavados três vezes em TCM-199 HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com soro fetal a 10% (SFB) e 50 ug de sulfato de gentamicina, e lavados uma vez com TCM-199 (Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de SFB, 5 ug de hormônio luteinizante (LH-Ayerst, Rouses Point, Nova Iorque, EUA),

0,5 ug de hormônio folículo estimulante (FSH Folltropin, Vetrepharm, Belleville, ON , Canadá), 1 ug de estradiol (estradiol-17β, Sigma E-8875), 2,2 mg de piruvato (Sigma P-4562), e 50 ug / ml de meio de gentamicina. Os COCs de cada vaca foram cultivados separadamente, durante 24 horas, em 100 ul de gotas de meio de maturação, sob óleo mineral (D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brasil) a 39 ° C e 5% de CO2 em ar (GORDON, 1994, SMITH et aL., 1996). Foram utilizados espermatozoides congelados-descongelados (2 X 10^8 /dose) de um único touro Nelore de fertilidade conhecida, com base na utilização anterior para a fecundação *in vitro* (FIV). Para a FIV, as palhetas foram descongeladas por 20 segundos em banho-maria com água a 35°C. Os espermatozoides foram lavados por centrifugação a 200 x g durante 30 min, num gradiente de 90-45% de Percoll. Os espermatozoides foram capacitados usando heparina (30 ug/ml) e a motilidade foi estimulada pela adição de 40 uL/mL de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE; Parrish, 1986). Após avaliação visual da motilidade, a concentração de espermatozoides foi ajustada para 25 x 10^6 espermatozoides móveis/mL e cada gota de fertilização recebeu 4 µL de espermatozoides (concentração final de 1 x 10^5 espermatozoides por gota; SENEDA et al, 2001.). Após a maturação, os COCs foram lavados três vezes em meio TCM 199 pré-fertilização suplementado com 25 mM de HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 0,3% de BSA (Sigma A-9647), e foram lavados uma vez em meio TALP fertilização suplementado com 10 g/mL de heparina e 160 mL de PHE (Parrish, 1986; Bavister, 1989). Dos presumíveis zigotos, as suas células do *cumulus* foram removidas e os mesmos transferidos para gotas de 100 ul de meio de cultivo para embriões (SOFaa BSA, contendo 8 mg/ml de BSA e glutamina 1 mM), sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera gasosa utilizado para a FIV. A taxa de blastocisto foi obtida a partir do total de oócitos viáveis aspirados. Os embriões foram avaliados até o dia 7 (Dia 0 = dia da FIV), de acordo com critérios da IETS (WRIGHT, 1998). As taxas de clivagem e blastocisto foram registradas nos dias 3 e 7 de cultivo, respectivamente. Embriões classificados como I, II e III foram definidos como viáveis. Blastocistos e blastocistos expandidos qualidade grau I foram submetidos à vitrificação pelo método Cryotop, conforme metodologia já descrita (KUWAYAMA et al., 2005).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias ± DP. Toda a análise estatística foi realizada usando o software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007). As taxas de clivagem e blastocisto, as proporções de oócitos e de embriões viáveis e vitrificados foram avaliadas utilizando-se o teste de Qui-quadrado. Para todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Vacas com alta produção de oócitos apresentaram maior proporção de oócitos viáveis, taxa de clivagem e de blastocisto, produção total de embriões e proporção de embriões vitrificáveis comparado aos grupos de intermediária e baixa produção de oócitos (Tabela 1). Vacas Nelore com alta produção de oócitos apresentaram produção de oócitos ~ 10 vezes maior e produziram ~ 30 vezes mais embriões viáveis em comparação com as de baixa produção de oócitos.

Tabela 1 – Potencial de desenvolvimento de oocitos recuperados (Média ± DP) de vacas de corte Nelore com alto (G-Alto, ≥ 40 oócitos), intermediário (G-Intermediário, 18 a 25 oócitos) e baixo (G-Baixo, ≤ 7 oócitos) número de oócitos recuperados por procedimento de OPU.

	G-Alto ≥ 40 oócitos n = 22	G-Intermediário 18-26 oócitos n = 25	G-Baixo ≤ 7 oócitos n = 19
Total de Oócitos Recuperados	1109[a]	534[b]	101[c]
Oócitos/ OPU	50,4 ± 11,3[a]	21,4 ± 3,0[b]	5,3 ± 1,5[c]
Oócitos Viáveis/ OPU	40,4 ± 10,6[a]	14,8 ± 3,0[b]	3,8 ± 1,1[c]
Oócitos Viáveis (%)	80,1[a]	69,5[b]	71,3[b]
Taxa de Clivagem (%)	79,0[a]	73,7[b]	70,7[b]
Taxa de Blastocisto (%)	42,0[a]	32,4[b]	13,0[c]
Total de Embriões/ OPU/PIVE	18,4 ± 6,7[a]	6,1 ± 3,6[b]	0,6 ± 0,7[c]
Embriões Vitrificáveis/ OPU/PIVE	15,0 ± 7,1[a]	4,7 ± 3,1[b]	0,4 ± 0,7[c]
Proporção de Vitrificáveis (%)	81,2[a]	77,1[b]	58,3[c]

[a-c] Valores na mesma linha diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$).

Discussão

O sucesso da PIVE tem sido correlacionado com a população folicular antral e a produção de oócitos (SINGH et al, 2004; PONTES et al, 2011; SILVA-SANTOS et al., 2013). Neste trabalho apresentamos uma comparação da produção de embriões PIVE entre vacas Nelore com diferentes produções oocitárias. Vacas Nelore com alta produção de oócitos após procedimento de OPU/PIVE, produziram ~ 10 vezes mais oócitos e ~ 30 vezes mais embriões que doadoras com baixa produção de oócitos.

A seleção de bovinos com base na contagem de folículos antrais é possível, pois existe alta repetibilidade durante as ondas de crescimento folicular para o mesmo indivíduo, independente de raça, idade, estação do ano e estágio de lactação (BURNS, et al, 2005; IRELAND et al., 2007, 2008; SILVA-SANTOS, 2013). Vacas com alta produção de oócitos apresentaram maior proporção de oócitos viáveis (80%) em relação às de intermediária (69%) e baixa produção de oócitos (71%, p <0,05). Silva-Santos et al. (2013) obtiveram maior quantidade de oócitos viáveis (21,6 vs 3,2) de novilhas de corte da raça Braford com alta (>40 folículos) vs baixa (<10 foliculos) CFA, respectivamente. Entretanto, os mesmos autores não verificaram diferença na proporção de oócitos viáveis entre doadoras com alta e baixa CFA (58,9 vs 55,2%; p >0,05; SILVA-SANTOS, 2013).

Nossos resultados demonstram que vacas Nelore com alta produção de oócitos possuem melhor qualidade oocitária, visto que a proporção de oócitos viáveis também foi maior para este grupo. A qualidade do oócito já foi anteriormente associada à população de folículos antrais. Vacas com baixa CFA apresentaram maior quantidade de marcadores de células do *cumulus* indicativos de menor qualidade do oócito (IRELAND et al., 2009).

No presente trabalho, vacas de alta produção de oócitos apresentaram maior taxa de clivagem e blastocisto, respectivamente (79%, 42%) em relação às de intermadiária (74%, 32%) e baixa produção de oócitos (71%, 13%; P<0,05). Para novilhas Braford, não foi relatada diferença entre as taxas de clivagem (61,5 vs 56,0%) e blastocisto (15,5 vs 9,5%) para os grupos de alta e baixa CFA, respectivamente (SILVA-SANTOS, 2013). Da mesma forma, IRELAND et al. (2007) não observaram diferenças na taxa de clivagem (74,7 vs 74,0%) e blastocisto (30,9 vs 29,6%) após fecundação *in vitro* de oócitos provenientes de ovários de matadouro

com alta e baixa CFA. No presente estudo, vacas de corte Nelore com alta produção de oócitos produziram ~ 10 vezes mais oócitos e ~ 30 vezes mais embriões viáveis em comparação com as de baixa produção de oócitos. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios, que relatam associação positiva entre a variação individual na produção de oócitos de vacas Nelore com a produção de embriões e as taxas de prenhez (PONTES et al., 2009, 2011). Estes autores relataram que doadoras com maior produção de oócitos (59 oócitos/OPU) produziram significativamente mais embriões e prenhezes (~ 6 vezes maior) do que aquelas com baixa produção de oócitos (10 oócitos/OPU; PONTES et al., 2011). Da mesma forma, outros autores relataram menor quantidade de embriões PIV (1,3 vs 4,9 embriões) a partir da aspiração de ovários de matadouro de vacas com baixo (<15 folículos) *vs* alto (>25 folículos) número de folículos antrais (IRELAND et al, 2007).

Com relação à taxa de embriões vitrificáveis, vacas Nelore com alta produção de oócitos apresentaram maior proporção de embriões vitrificáveis (81%) em relação às de intermediária (77%) e baixa produção de oócitos (58%, p <0,05). Da mesma forma, a proporção de embriões vitrificáveis diferiu entre novilhas Braford com alta vs baixa CFA (67,2 vs 36,4%, p<0,05; SILVA-SANTOS, 2013).

Concluimos que existe grande variação individual na produção de oócitos entre fêmeas bovinas. Vacas Nelore com maior produção de oócitos apresentaram maior proporção de oócitos viáveis, taxa de clivagem e blastocisto e proporção de embriões vitrificáveis, comparado às de intermediária e baixa produção de oócitos. Dessa forma, a identificação de fêmeas bovinas com alta CFA/ produção de oócitos poderia servir de parâmetro para aumentar a quantidade de embriões produzidos *in vitro*.

Referências

AYRES, M.; AYRES JR.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. 2007. BioEstat 5.0. Statistical applications in biological and medical sciences. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 59pp.

BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, p.139–158, 1989.

BURNS, D.S., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse

association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** 1st ed. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994.

IRELAND, J.L.H., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F.,THEMMEN, A.P.N., WARD, F., LONERGAN, P., SMITH, G.W., PEREZ, G.I., EVANS, A.C.O., IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.

IRELAND, J.J., SMITH, G.W., SCHEETZA, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGERA, J.K., IRELAND, J.L.H., MOSSA, F., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.1–14, 2011.

IRELAND, J.J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–1695, 2007.

IRELAND, J.J., ZIELAK, A.E., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J., BETTEGOWDA, A., SCHEETZ, D., WALSH, S., MOSSA, F., KNIGHT, P.G., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.

KUWAYAMA, M., VAJTA, G., KATO, O., LEIBO, S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine,** v.11, p.300–308, 2005.

LOWMAN, B.G., SCOTT, N.A., SOMERVILLE, S.H. Condition scoring of cattle, Revised edition. **East Scotland College of Agriculture**, p.1-31, 1976 (Bulletin 6).

MOSSA, F., S. W. WALSH, S. T. BUTLER, D. P. BERRY, F. CARTER, P. LONERGAN, G. W. SMITH, J. J. IRELAND, AND A. C. EVANS. Low numbers of ovarian follicles ≥3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. J. Dairy Sci. 2012.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFRIEDGE-RUTHEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.

PONTES, J.H.F., MELO-STERZA, F.A., BASSO, A.C., FERREIRA, C.R., SANCHES, B.V., RUBIN, K.C.P., SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.

PONTES, J.H.F., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., OLIVEIRA, J.A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. **Animal Reproduction Science,** v.67, p.37– 43, 2001.

SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.

SILVA-SANTOS, Katia Cristina. **Comparação da produção de embrião, população de folículos pré-antrais ovariana e do teor de lipídios nos oócitos entre fêmeas bovinas com alta e baixa contagem de folículos antrais**. 2013. 151f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SINGH, J., DOMINGUEZ, M., JAISWAL, R., ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227–243, 2004.

SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozogous carriers or non-carriers of the FecB gene. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.41-54, 1994.

6 DISCUSSÃO GERAL

Nos útlimos anos, muitas pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de melhorar os índices reprodutivos, alcançados com a utilização das diferentes biotecnologias. O Brasil apresenta-se em destaque no cenário mundial liderando a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e gerando um grande volume de informações em relação aos programas de sincronização da ovulação (IATF), principalmente em animais zebuínos. Os protocolos, tanto para programas de IATF ou PIVE, já estão bem estabelecidos e seu conhecimento e utilização bem democratizados.

Com o intuito de melhorar os índices reprodutivos, tem-se procurado características individuais, que sinalizem indivíduos que apresentam um melhor desempenho reprodutivo quando submetidos às biotecnologia reprodutivas. Vários grupos de pesquisa vêm estudando os fatores individuais, ligados à oôgenese e foliculogênese, e sua influência sobre o desempenho reprodutivo de bovinos.

Alguns trabalhos com fêmeas *Bos taurus* mostraram haver repetibilidade no número de folículos antrais por onda de crescimento folicular. Fêmeas *Bos taurus* cruzadas com alta CFA apresentaram maior quantidade de folículos pré-antrais comparado a fêmeas com baixa CFA. Alguns autores vêm correlacionando a baixa CFA com características relacionadas à baixa fertilidade, como ovários pequenos, baixa espessura endometrial, baixos níveis de P4 sérico, altos níveis de FSH, baixos níveis de AMH e oócitos de menor qualidade. Porém, vale ressaltar que a maior parte destes estudos foram conduzidos com fêmeas bovinas taurinas.

No primeiro artigo, objetivamos comparar a influência da CFA sobre a taxa de concepção de vacas Nelore (zebuínas) submetidas à programa de IATF. Neste trabalho, observamos novamente grande variação na CFA entre os indivíduos. Observamos que vacas com alta e baixa CFA apresentaram taxa de concepção semelhantes. Porém, vacas com baixa CFA apresentaram taxa de concepção superior às de intermediária CFA. Este fator deve ser considerado, visto que, neste experimento, as vacas de intermediária CFA representavam aproximadamente 60% da população experimental e, as de baixa CFA, 20%.

No Artigo 2, avaliamos a produção de embriões de vacas com alta, intermediária e baixa CFA submetidas à programa de OPU/PIVE. Diferente do

primeiro experimento, observamos que as vacas de alta CFA apresentaram melhor desempenho reprodutivo. As vacas de alta CFA apresentaram uma produção 10 vezes superior de oócitos, sendo estes de qualidade superior, pois a taxa de oócitos viáveis foi superior para estas vacas em comparação com as de intermediária e baixa CFA. A melhor qualidade oócitária pode ser comprovada, pelo fato da produção de embriões ter sido 30 vezes maior para as vacas de alta em relação às de baixa.

Neste sentido, surge uma grande dúvida: como pode, em uma determinada biotecnologia, as vacas de baixa apresentarem um desempenho reprodutivo superior e, em outra, apresentarem desempenho inferior? Várias hipóteses devem ser levantadas, entre as principais, o ambiente folicular; a secreção, competição e o aproveitamento dos hormônios gonadotróficos; a qualidade oócitária; e o fato do folículo/oócito na IATF se desenvolver *in vivo* e na PIVE, *in vitro*, sendo que, na última, os fatores são minimizados ao ambiente controlado e à suplementação com nutrientes.

A grande contribuição com os estudos apresentados é demonstrar que o individuo que responde bem a uma biotecnologia reprodutiva não obrigatoriamente irá responder da mesma maneira a outra biotecnologia. Desta maneira, a busca por marcadores e seleção de características individuais e indivíduos deve continuar para que estes questionamentos possam cada vez mais ser esclarecidos.

Ainda, algumas questões devem ser consideradas antes da utilização da CFA como seleção de fêmeas bovinas: (i) fertilidade de fêmeas de alta e baixa CFA conforme a raça e a categoria (vaca, novilha), (ii) qualidade oócitária de folículos de diferentes diâmetros para vacas de diferentes CFAs, e (iii) impacto da seleção de fêmeas de alta e baixa CFA no rebanho nacional.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A população de folículos antrais ovarianos de fêmeas de corte da raça Nelore não apresentou influência positiva sobre a taxa de concepção à IATF, visto que vacas com alta ou baixa CFA apresentaram taxas de concepção semelhantes;
- Vacas de corte Nelore com baixa CFA apresentaram taxa de concepção à IATF superior a de vacas com intermediária CFA;
- Concluimos que existe grande variação individual na produção de oócitos entre fêmeas Nelore. Vacas Nelore com maior produção de oócitos apresentaram maior proporção de oócitos viáveis, maiores taxas de clivagem e blastocisto e proporção de embriões vitrificáveis, comparado às de intermediária e baixa produção de oócitos.