

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DINÂMICA FOLICULAR E AVALIAÇÃO DE
MANIPULAÇÃO HORMONAL EM BEZERRAS
NELORE VISANDO A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES**

Thaís Abritta Zacarias
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DINÂMICA FOLICULAR E AVALIAÇÃO DE
MANIPULAÇÃO HORMONAL EM BEZERRAS
NELORE VISANDO A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES**

Thaís Abritta Zacarias

**Orientador: Dr. Maurício Machaim Franco
Co-orientador: Dr. Ricardo Alamino Figueiredo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a Obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

Uberlândia - MG
Março - 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,
Brasil.

Z13d Zacarias, Thais Abritta, 1990-
2015 Dinâmica folicular e avaliação de manipulação hormonal em
 bezerras nelore visando a produção *in vitro* de embriões / Thais Abritta
 Zacarias. - 2015.
 92 f. : il.

Orientador: Maurício Machaim Franco.
Coorientador: Ricardo Alamino Figueiredo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Reprodução - Teses. 3.
Fertilização *in vitro* - Teses. 4. Nelore (Zebu) - Teses. I. Franco,
Maurício Machaim, 1965-. II. Figueiredo, Ricardo Alamino. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thaís Abritta Zacarias, filha de Renato Carlos Anselmo Zacarias e Denise Abritta, nasceu em São José do Rio Preto, São Paulo, em 12 de dezembro de 1990. Em janeiro de 2013, graduou-se como Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Campus Avançado de Umuarama. Durante a graduação foi monitora de Histologia e Forragicultura, e estagiária do Laboratório de Microbiologia. Participou do Projeto de Iniciação Científica intitulado “Avaliação da contagem bacteriana total (CBT) e identificação de bactérias potencialmente patogênicas em amostras de leite de ovelhas em lactação com cria ao pé”. Participou do Centro Acadêmico de Medicina Veterinária. Em março de 2013, ingressou no programa de Pós-Graduação das Ciências Veterinárias, na área de Produção Animal da Universidade Federal de Uberlândia – MG, executando trabalho experimental na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília – DF).

*“Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento.”
Clarice Lispector*

*“Aquilo que se vê não foi feito do que é visível.”
Hebreus 11.3*

*“Nem mesmo as muitas águas conseguem apagar o amor;
os rios não conseguem arrastá-lo correnteza abaixo.
Quisesse alguém dar tudo o que possui para comprar o amor,
qualquer valor seria absolutamente desprezado.”*

Cantares 8:7

*À Deus e à minha amada família: Denise Abritta,
Renato C. A. Zacarias, Renato A. Zacarias,
Ednan Abrita, Luzia de Lima Abritta
Dedico...*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, por ter dado tudo pela minha vida. *Nós amamos a Ele porque Ele nos amou primeiro.*

Aos meus pais Denise Abritta e Renato C. A. Zacarias, e avós Ednan Abritta e Luzia de Lima Abritta, por me apoiarem e serem meus grandes exemplos de caráter, autoridade, amor e união.

Ao meu orientador Maurício Machaim Franco, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar o mestrado. Por ser um exemplo de profissional dedicado e otimista.

Ao meu co-orientador Ricardo Alamino Figueiredo, pelos ensinamentos, paciência e dedicação. Por ter acreditado em mim e no que era “invisível” e tornou-se real.

Aos pesquisadores da Embrapa-Cenargen: Dra Margot Alves Nunes Dode, Dra Bianca Damiani pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Embrapa – Fazenda Sucupira que dispuseram seu tempo e sua dedicação aos treinamentos e ao experimento de forma excelente: Rosângela dos Santos, Conceição Pereira da Cruz, Adolfo, José A. da Costa (Seu Zequinha), Sidney Barbosa Maia, Eduardo Porto (Dudu), Milton, Dona Mara, Pelé, Seu Arlindo, Japão, Weber. Agradeço de forma especial ao meu querido amigo Urias Câmara que se dispôs (investindo seu tempo, até fora do expediente) ao experimento, projetando a maca para laparoscopia, acrescentando cada dia algo diferente, preparando os materiais, para que tudo ocorresse perfeitamente.

Aos estagiários presentes de Deus: Sarah Rodrigues, Roberta Lopez, Leandro da Silva Gomes, que se dedicaram aos trabalhos sem medir esforços.

A todos os alunos que me ajudaram durante o experimento: Ana Luiza Silva Guimarães, Nayara Ribeiro Kussano, Mateus Diógenes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, professores e funcionários, em especial: Célia Regina e Ricarda.

À toda minha família, em especial às queridas: Patrícia Abritta, Isabela Abritta e Ana Luiza Abritta que abriram as portas da sua casa com carinho. Ao meu irmão Renato Abritta Zacarias e a minha cunhada Elis Zacarias, pessoas especiais.

Assim como os perfumes alegram a vida, a amizade sincera dá ânimo para viver (Pv 27:9)... Aos meus amigos:

João Ricardo Scaliante Junior (John), Netto Sena, Malane Muniz. Amigos para todos os momentos.

Aos queridos amigos de Uberlândia, que já fazem parte da minha família: Ana Abadia dos Santos Mendonça, Seu Omilton, Juliana Mendonça e Anelise Mendonça, que puseram à disposição sua casa e seus corações.

Aos amigos de Rio Preto: Marcelo e Simone Rosa; José Wilson e Luany Paladino; Rosângela, Maria José, Andressa e Evelyn; William e Roberta; Gislane e Alan; Vinicius.

Aos amigos de Brasília: Marco Antônio e Francis, Pedro e Jéssica, Renato e Priscila, Aline (minha princesa), Thalita, Polliana, Iohane, Bruno, Renato Medeiros (e à toda célula) e Renato Tavares.

Aos componentes da banca examinadora, pela disposição em contribuir com este trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por disponibilizar a estrutura para realização do experimento.

À Embrapa, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

À todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1.CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 Endocrinologia da Reprodução de Fêmeas Bovinas Pré-Púberes...	17
1.2 Foliculogênese ovariana e desenvolvimento folicular ovariano em fêmeas Bovinas.....	18
1.3 Coleta de ovócitos em bezerras.....	20
1.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões em fêmeas pré-púberes.....	21
1.5 Desenvolvimento folicular em <i>Bos taurus taurus</i> vs <i>Bos taurus</i> <i>indicus</i>	25
1.6 Objetivos.....	27
1.7 REFERÊNCIAS.....	27
2. CAPÍTULO 2 ¹ – DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM BEZERRAS NELORE (<i>Bos taurus indicus</i>) DE DOIS A TRÊS MESES DE IDADE.....	38
2.1 INTRODUÇÃO.....	39
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.2.1 Localização e período do ano.....	41
2.2.2 Animais.....	41
2.2.3 Exames ultrassonográficos e registro dos dados.....	42
2.2.4 Análise de dados.....	43
2.3 RESULTADOS.....	43
2.4 DISCUSSÃO.....	48
2.5 REFERÊNCIAS.....	50
3. CAPÍTULO 3 – VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO DE TRATAMENTO HORMONAL EM BEZERRAS NELORE PARA VISANDO A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	55

3.1 INTRODUÇÃO.....	56
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.2.1 Localização.....	58
3.2.2 Animais.....	59
3.2.3 Grupos experimentais.....	60
3.2.4 Grupo controle (GC).....	60
3.2.5 Grupo tratado (GT).....	60
3.2.6 Protocolo hormonal das receptoras de embrião.....	61
3.2.7 Jejum pré-procedimentos.....	62
3.2.8 Protocolo anestésico e procedimento laparoscópico.....	62
3.2.9 Ultrassonografia.....	64
3.2.10 PIVE.....	64
3.2.11 Análise estatística.....	66
3.3 RESULTADOS.....	66
3.3.1 Avaliação ultrassonográfica das características ovarianas.....	66
3.3.2 Aspiração folicular (OPU) e produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	68
3.4 DISCUSSÃO.....	71
3.4.1 Protocolo hormonal e características ovarianas.....	71
3.4.2 Protocolo hormonal e aspiração folicular.....	73
3.4.3 Protocolo hormonal e PIVE.....	74
3.5 CONCLUSÕES.....	77
3.6 PERSPECTIVAS.....	77
3.7 REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CG – Células da Granulosa

COC – Complexo *Cumulus*-ovócito

D0 – Dia 0 do protocolo hormonal

D1 – Dia 1 do protocolo hormonal

D4 – Dia 4 do protocolo hormonal

D7 – Dia 7 do protocolo hormonal

D_{0R} – Dia 0 do protocolo das receptoras

D_{8R} – Dia 8 do protocolo das receptoras

D_{9R} – Dia 9 do protocolo das receptoras

D_{17R} – Dia 17 do protocolo das receptoras

E.V. – Endovenoso

E₂ – Estradiol

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GA – Grupo Abatedouro

GC – Grupo Controle

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

GT – Grupo Tratado

I.M. – intramuscular

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

LH - Hormônio Luteinizante

LRA – Laboratório de Reprodução Animal

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mm - Milímetro

OPU – *ovum pick-up*, aspiração folicular

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

SFB – Soro Fetal Bovino

μ L - Microlitro

μ m - Micrometro

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 - Características dos ovários e ondas foliculares apresentadas na ultrassonografia de bezerras Zebu.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 - Dinâmica follicular em bezerra de 3 meses de idade.....	45
Figura 2.2 - Dinâmica follicular em bezerra de 3 meses de idade.....	45
Figura 2.3 - Dinâmica follicular em bezerra de 3 meses de idade.....	46
Figura 2.4 - Dinâmica follicular em bezerra de 2,5 meses de idade.....	46
Figura 2.5 - Dinâmica follicular em bezerra de 2,25 meses de idade.....	47
Figura 2.6 - Dinâmica follicular em bezerra de 2,5 meses de idade.....	47
Figura 3.1 - Bezzerras Nelore de 4 a 7 meses de idade utilizadas no experimento de aspiração folicular por laparoscopia.....	59
....	
Figura 3.2 - Representação esquemática do protocolo hormonal utilizado em bezerras de 4 a 7 meses de idade.....	61
Figura 3.3 – Procedimento de Aspiração Folicular por Laparoscopia em bezerras. A – Trocarte para inserção do Sistema de Aspiração; B – Trocarte para inserção do Laparoscópio; C – Trocarte para inserção da Pinça Anatômica; 1 – Sistema de Aspiração (agulha conectada à mangueira de aspiração, guiada pela cânula de metal); 2 – Tubo Cônico para coleta do conteúdo folicular; 3 – Laparoscópio; 4 – Pinça Anatômica.....	63

Figura 3.4 – Procedimento de Ultrassonografia em bezerras.....	64
Figura 3.5 – Rastreamento e Classificação dos ovócitos aspirados de bezerras Nelore de 4 a 7 meses de idade	65
Figura 3.6 - Média ± DP das características ovarianas (diâmetro – cm e número de folículos) de bezerras do Grupo Controle (que sofreram ablação folicular) e do Grupo Tratado (submetidas a um protocolo hormonal com Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH). Colunas com números diferentes, classificadas em letras iguais, diferem significativamente ($p<0,05$).....	68
Figura 3.7 - Ovócitos aspirados de bezerras pré-púberes de 4 a 7 meses de idade, do Grupo Tratado (A, protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e Grupo Controle (B, ablação folicular).....	69
Figura 3.8 - Ovócitos recuperados a partir de bezerras do Grupo Controle (ablação folicular), e do Grupo Tratado (protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH).....	69
Figura 3.9 - Produção <i>in vitro</i> de embriões a partir de ovócitos de bezerras do Grupo Controle (GC, ablação folicular), Grupo Tratado (GT, protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e do Grupo Abatedouro (GA, ovários de animais adultos abatidos).....	70
Figura 3.10 - Embriões em D7 do Grupo Controle (A, ablação folicular), Grupo Tratado (B, protocolo utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e do Grupo Abatedouro (C, ovários de animais adultos abatidos).....	71

DINÂMICA FOLICULAR E AVALIAÇÃO DE MANIPULAÇÃO HORMONAL EM BEZERRAS NELORE VISANDO A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

RESUMO – O estudo da dinâmica folicular de fêmeas bovinas pré-púberes e de estratégias de manejos reprodutivos que possibilitem a inclusão desses animais na produção *in vitro* de embriões (PIVE) podem acelerar o ganho genético do rebanho pela diminuição do intervalo entre gerações. Monitorou-se por ultrassom, durante 18 dias, a dinâmica folicular de 10 bezerras Nelore de 2-3 meses de idade. Foram detectadas até 3 ondas de crescimento folicular anovulatórias com $31,4 \pm 3,45$ folículos visíveis, onde os folículos dominantes possuíam diâmetro máximo de $3,03 \pm 0,17$ mm. Adicionalmente, avaliou-se um tratamento hormonal sobre a *Ovum Pick Up* (OPU)/PIVE de 9 bezerras Nelore de 4-7 meses de idade, em delineamento *cross-over*. O Grupo Tratado-GT ($n=9$. Dispositivo de Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) apresentou aumento na população folicular ($20,0 \pm 4,95$ em D0 vs $26,66 \pm 4,24$ em D7), de folículos $\geq 2,5$ mm ($4,11 \pm 1,96$ em D0 vs $11,55 \pm 4,09$ em D7), no número de folículos aspirados (95 vs 152, respectivamente para o Grupo Controle-GC; $n=9$ e GT), porém sem aumentar o número de blastocistos em D7 (3 vs 9, respectivamente para GC e GT) e o número de embriões por fêmea doadora (0,33 vs 1,0, respectivamente para GC e GT). Concluindo, apesar das bezerras Nelore avaliadas apresentarem diâmetros foliculares menores, o padrão de ondas foliculares e o número de folículos detectados foram similares aos reportados em fêmeas Zebu, em atividade reprodutiva. O tratamento hormonal aumentou a população folicular e o número de folículos aspirados, porém não se verificou a viabilização da PIVE pelo seu uso nestes animais.

Palavras-chave: estimulação hormonal, fêmeas pré-puberdes, OPU, PIVE.

FOLLICULAR DYNAMICS AND EVALUATION OF A HORMONE TREATMENT IN NELORE CALVES FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION

ABSTRACT – The study of prepubertal bovine follicular dynamics and the reproductive management investigation for including these animals on in vitro embryo production (IVP) could be an alternative for accelerating genetic gain by reducing the generation interval. Follicular dynamics was monitored daily by ultrasound in ten Nelore calves (2-3 months of age), during 18 consecutive days. A successive anovulatory follicular wave-like pattern was identified, where until 3 follicular growth waves were detected with 31.4 ± 3.45 follicles and dominant follicles maximum diameter of 3.03 ± 0.17 mm. Additionally, a hormonal treatment for Ovum Pick Up (OPU)/IVP in 9 Nelore calves (4-7 months of age) were evaluated in a cross-over design. The treated group - TG (n=9. Progesterone, Estradiol Benzoate, FSH and LH) had the follicular population increased (20.0 ± 4.95 in D0 to 26.66 ± 4.24 in D7) as the follicles ≥ 2.5 mm number (4.11 ± 1.96 in D0 to 11.55 ± 4.09 in D7) and even the aspirated follicles number (95 vs 152, respectively for control group – CG; n=9 and TG). However, the number of blastocysts in D7 (3 vs 9, respectively for CG and TG) and the number of embryos per donor (0.33 vs 1.0, respectively for CG and TG) were not increased by the treatment. In summary, despite the Nelore calves showed smaller follicular diameters, the follicular wave pattern and the number of follicles were similar to those results reported in Zebu females, in reproductive activity. The hormonal treatment increased the follicular population and the aspirated follicles number, but it was not verified that IVP was enabled by its use in those animals.

Key Words: hormonal treatment, prepubertal bovine female, OPU, IVP.

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 198,7 milhões de animais (ANUALPEC, 2014). Aproximadamente 80% deste rebanho é composto por animais zebuínos (*Bos taurus indicus*), que possuem características de rusticidade e adaptação às condições da pecuária do país.

O desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida (TRA) aplicadas em animais permitiu um avanço na otimização e na multiplicação de animais de interesse, contribuindo tanto para a produção quanto para a conservação animal (MARTINS *et al.*, 2011). A utilização de técnicas como a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), em matrizes de elevado mérito genético aumenta consideravelmente o número de produtos/vaca/ano comparado à produção fisiológica de uma fêmea. Além disso, a PIVE permite a utilização de fêmeas com problemas de monta adquiridos, assim como o uso de fêmeas fora da idade reprodutiva (animais senis ou pré-púberes; SARTORI *et al.*, 2010). A PIVE no Brasil, antes utilizada somente para fins de pesquisa, após seu incremento, possibilitou o país se tornar o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo (VIANA *et al.*, 2010).

Assim, a inclusão de fêmeas pré-púberes na PIVE pode diminuir o intervalo de gerações, acelerando o ganho genético do rebanho (LOHUIS, 1995). Apesar disso, diversas barreiras têm sido encontradas para a utilização desses animais, sendo que estudos indicam uma menor competência apresentada pelos ovócitos provindos de bezerras, sugerindo deficiência no citoplasma ovocitário (LEVESQUE & SIRARD *et al.* 1994; ARMSTRONG, 2001; SALAMONE *et al.* 2001).

Estudos mais detalhados das características reprodutivas de fêmeas pré-púberes envolvendo endocrinologia, características ovarianas e foliculares, assim como de métodos que melhorem as condições para coleta de ovócitos e

a PIVE, podem trazer importantes informações para incrementar a técnica e permitir a utilização desses animais, tanto como modelos para pesquisa, como futuramente no setor produtivo.

1.1 Endocrinologia da reprodução de fêmeas bovinas pré-púberes

A atividade ovariana é regulada por processos que envolvem fatores intrafoliculares e sinalização extraovariana, tendo as gonadotrofinas importante papel (OLIVEIRA, 2011). Desde o nascimento as fêmeas bovinas já são capazes de produzir e liberar o FSH (Hormônio Folículo Estimulante), portanto, já apresentam ondas foliculares ovarianas. Porém, essas ondas não chegam à ovulação até que se atinja a puberdade (EVANS, *et al.* 1995). Em animais pré-púberes, pequena quantidade de E₂ (Estradiol) secretada pelos folículos ovarianos em bovinos é responsável pela supressão da secreção pulsátil de LH (Hormônio Luteinizante) e o hipotálamo possui uma sensibilidade excessiva a este hormônio (EVANS *et al.*, 1994, 1995; DAY *et al.*, 1987). A concentração de E₂ tende a aumentar conforme a idade e, sua secreção, associa-se com o final da fase de crescimento do folículo dominante (EVANS *et al.* 1994; 1995). Próximo à puberdade, devido a uma maturação cronológica do eixo hipotalâmico-hipofisário, há uma reversão do *feedback* negativo ao estradiol para positivo, ocorrendo portanto, um aumento da pulsatilidade de LH a partir do estímulo daquele hormônio (RODRIGUES *et al.*, 2002)

Antes da puberdade há dois períodos de aumento da secreção pulsátil de LH, segundo Cardoso & Nogueira (2007): um ocorre no início da pré-puberdade e outro que marca a transição para a peripuberdade. Evans *et al.* (1994), avaliando fêmeas bovinas de 2 a 36 semanas de idade, observaram elevação nas concentrações de FSH e LH entre 4 e 14 semanas de idade. Especularam ainda que, esta elevação na secreção de gonadotrofinas, estimulou o aumento do número e do diâmetro dos folículos ovarianos indicando ser esta idade uma etapa importante no desenvolvimento reprodutivo dos animais.

1.2 Foliculogênese ovariana e desenvolvimento folicular ovariano em fêmeas Bovinas

Segundo Erickson (1966 a,b) os folículos antrais podem começar a ser visualizados aos 250 dias de gestação em um feto bovino fêmea. Este autor relatou que, ao nascer, uma bezerra pode possuir até 300.000 ovócitos, contendo poucos folículos antrais detectáveis (7 ± 2). Afirmou ainda que o número de folículos antrais começa a aumentar a partir da idade de dois meses (49 ± 10), havendo um decréscimo destes (33 ± 9) aos oito meses de idade.

O desenvolvimento dos folículos antrais em fêmeas bovinas se dá em um padrão de ondas de crescimento folicular, quando um folículo cresce mais (dominante) que os demais (subordinados) e pode posteriormente sofrer atresia ou ovular (em fêmeas pós-púberes), seja em animais de origem européia (*Bos taurus taurus*, PIERSON & GINTHER, 1988; SAVIO *et al.*, 1988 e SIROIS & FORTUNE, 1988) como nos de origem india (*Bos taurus indicus*, RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997, GAMBINI *et al.* 1999; VIANA *et al.*, 2000; GINTHER *et al.*, 2003 e SARTORI & BARROS, 2011). Estas ondas de desenvolvimento dos folículos aparecem tanto em fêmeas pós-púberes (duas ou três ondas até a ovulação) quanto em fêmeas pré-púberes (crescimento contínuo de folículos; ADAMS *et al.*, 1994 e EVANS *et al.*, 1994). Em animais pré-púberes a atividade de hormônios reprodutivos é imatura, fazendo com que os folículos dominantes possuam seu diâmetro máximo reduzido (próximo a 5mm em bezerras Nelore de 60 a 90 dias de idade; MALARD *et al.*, 2001; e $9,4\pm0,3$ mm em novilhas de aproximadamente 22 meses; REIS *et al.*, 2005) comparado ao de fêmeas Nelore adultas ($11,3\pm0,35$ mm em vacas; FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

Durante o ciclo estral, há um desenvolvimento dos folículos pré-antrais seguido da formação do antro e do crescimento dos folículos antrais. A maioria desses folículos não será capaz de continuar seu crescimento durante o ciclo estral, entrando assim em processo de atresia. A duração total do desenvolvimento de folículos primordiais até ovulatórios é estimado em 180

dias na vaca, sendo que 42 dias correspondem ao período de crescimento do folículo antral à ovulatório (LUSSIER *et al.* 1987).

- Folículo pré-antral

Os folículos ovarianos são formados durante a vida fetal, quando o ovócito é envolvido por uma única camada de células da granulosa (CG) achatadas, essas células se tornam cuboidais e começam a expressar marcadores de proliferação celular. Folículos com células achatadas e cuboidais são frequentemente observados *in vivo*, e a transição do estágio primordial ao primário pode ser longa. O segundo estágio começa com o desenvolvimento da segunda camada de CG, progride através da adição de até seis ou sete camadas, e termina com o desenvolvimento gradual de uma cavidade antral com um diâmetro folicular de cerca de 250 μ m (WANDJI *et al.*, 1996, 1997).

Os estágios dos folículos pré-antrais são definidos como primordial, primário, pequeno pré-antral (30-90 μ m), pré-antral com tamanho médio (90-150 μ m) e grande pré-antral (150-220 μ m; FORTUNE, 2003).

Têm-se afirmado que o desenvolvimento de folículos pré-antrais é independente de gonadotrofinas, regulado predominantemente por fatores intra-ovarianos (GONG *et al.*, 1996; WANDJI *et al.*, 1992; FORTUNE *et al.*, 2000). Porém, RNAm para receptores de FSH (FSHr) foram detectados em folículos com apenas uma ou duas camadas de CG (BAO & GARVERICK, 1998), além disso, observou-se um crescimento folicular pré-antral após a adição de FSH ao meio de cultura, sugerindo um papel coadjuvante do hormônio neste estágio (MCNATTY *et al.*, 1999; GUTIERREZ *et al.*, 2000). Com relação ao LH, foi observada a expressão de RNAm para seus receptores (LHr) pela primeira vez quando a teca interna é formada ao redor das células da granulosa (BAO e GARVERICK, 1998).

No entanto, são ainda pouco entendidos os mecanismos que controlam a ativação de folículos ovarianos em animais de interesse zootécnico. Sabe-se, por exemplo, que esta ativação está relacionada com mecanismos autócrinos e parácrinos e que fatores ativadores se originam das células da granulosa, que circundam o ovócito e do próprio ovócito (BINELLI *et al.*, 2009). Mcnatty *et al.*

(2007) identificaram alguns destes fatores envolvidos no desenvolvimento inicial de folículos, como o BMP15 (*Bone Morphogenetic Protein15*) e o GDF9 (*Growth-Differentiation Factor 9*), relatando que a ausência ou deficiência destes leva ao bloqueio no início da foliculogênese e influencia, inclusive, a taxa de ovulação de ovelhas. Outros fatores também são relatados como associados a esta fase de crescimento folicular (Ex.: ativina-A, Hulshof *et al.*, 1997; inibina, Wrathal e Knight, 1995; e folistatina, Glister *et al.*, 2006). Hulshof *et al.* (1997) demonstraram em bovinos que a ativina-A, associada ao FSH, estimula o crescimento de folículos pré-antrais. Além disso, a ativina-A é descrita como um fator de sobrevivência de folículos inclusos no tecido ovariano (SILVA *et al.*, 2006).

- Folículo antral

A maioria dos animais domésticos possui o desenvolvimento folicular em padrão de ondas e segundo Evans *et al.* (1994), bezerras a partir de 2 semanas de idade já desenvolvem ondas de crescimento folicular similares às de fêmeas adultas. A dinâmica folicular de vacas Nelore é caracterizada predominantemente por duas ou três ondas foliculares (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; SARTORI & BARROS, 2011). O número de ondas é influenciado pelas concentrações periféricas de inibina-A e FSH, sendo este o responsável pelo intervalo para emergência da onda subsequente através de um aumento da sua secreção (HAFEZ & HAFEZ, 2004) e o crescimento do folículo antral a partir de 2mm de diâmetro está sob controle de gonadotrofinas (FSH; CAMPBELL *et al.*, 1995).

1.3 Coleta de ovócitos em bezerras

Diversas formas de coleta de ovócitos em bezerras têm sido descritas, como àquela através de laparatomia (MALARD *et al.*, 2001), laparoscopia (ARMSTRONG *et al.*, 1994; TANEJA *et al.*, 2000; KAUFFOLD *et al.*, 2005), de aspiração transvaginal com a auxílio da ultrassonografia (*probe transvaginal curvilínea adaptada à partir da de uso em humanos*, PRESICCE *et al.*, 1997); e de guia de aspiração orientada por ultrassonografia transvaginal, esta última

utilizada em novilhas pré-púberes de idade mais avançada (10 a 12 meses de idade, SNEL-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Uma forma de coleta adequada para bezerras de até 7 meses de idade é a laparoscopia, levando-se em consideração o menor porte dos animais, a funcionalidade da técnica e a breve recuperação do animal após o procedimento.

1.4 Produção *in vitro* de embriões em fêmeas pré-púberes

- Estimulação hormonal

Considerando a possibilidade de inclusão de bezerras jovens em programas de PIVE (Produção *in vitro* de Embriões), protocolos hormonais são utilizados visando aumentar o número e o tamanho dos folículos a serem aspirados nas OPUs (*Ovum pick-up*), para promover a sincronização do melhor momento para a recuperação de ovócitos e ainda se buscar melhorar a competência ovocitária *in vivo* pela ativação de processos biosintéticos (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Há, porém, grande variabilidade de resultados e alguns estudos relataram que a utilização de protocolos com FSH em bezerras (*Bos taurus taurus*) de 2,5 a 5 meses aumentou o número de folículos nos ovários (de 23,4 ± 6,1 para 55,1 ± 16,1; TANEJA *et al.*, 2000), dobrou a recuperação de ovócitos por doadora (de 19 para 40, REVEL *et al.*, 1995 e de 37 para 71, EARL *et al.*, 1998), aumentou de 2 a 4 vezes a produção de blastocistos por doadora (de 1,4 para 3,3, REVEL *et al.*, 1995 e de 3 para 12, EARL *et al.*, 1998) com variação de 2,4 a 12 blastocistos produzidos por doadora (REVEL *et al.*, 1995; TERVIT, 1996; EARL *et al.*, 1998) e porcentagens de prenhez entre 4% e 33% (KAJIHARA *et al.*, 1991; ARMSTRONG *et al.*, 1992; REVEL *et al.*, 1995; KAUFFOLD *et al.*, 2005). Taneja *et al.* (2000) observaram ainda que existe uma alta correlação ($r=0,95$) entre a quantidade de folículos observada antes e após a estimulação hormonal. Portanto, animais que se apresentam com maior população de folículos antrais nos ovários pré-estimulação produzirão melhores respostas após o estímulo hormonal.

Avaliando-se alguns estudos, verifica-se que a maturação *in vivo* de ovócitos pode ser induzida expondo-se os folículos responsivos sob a ação de um pico de LH endógeno ou exógeno, em um intervalo apropriado antes da OPU (VOS *et al.*, 1996, DOCCHIO *et al.*, 1997 e PRICE, 1999).

Porém, a dificuldade em promover esta adequada exposição hormonal é prever precisamente quando ocorre a liberação do LH e assim poder coletar os ovócitos no momento mais adequado. Procurando controlar este pico de LH, em alguns trabalhos (ARMSTRONG *et al.*, 1997; EARL *et al.*, 1998) foram utilizados pessários de progestágenos (induzem *feedback* negativo sobre a secreção de gonadotrofinas) e, no momento da retirada destes dispositivos, foram aplicados LH ou GnRH nas fêmeas para estimular a maturação ovocitária. Este protocolo resultou em uma grande variação no grau de maturação dos ovócitos recuperados de bezerras 24h após as injeções, produzindo ovócitos maduros nas proporções de 43% no tratamento com LH e 69% no tratamento com GnRH. A efetividade no uso destes pessários de progestágenos depende do equilíbrio entre a vantagem da supressão momentânea do LH visando sincronizar a maturação ovocitária e a desvantagem do bloqueio concomitante do FSH, que, por consequência, reduz o número de ovócitos recuperados. Earl *et al.* (1998), buscaram alternativas para evitar este efeito supressório dos progestágenos sobre o FSH em bezerras reduzindo os estímulos de FSH de 3 para 1 ou 2 dias. Esta redução no estímulo do FSH resultou na recuperação de ovócitos imaturos de folículos antes que estes disparassem o pico de LH. Os autores utilizaram ainda este regime abreviado de FSH sem progestágenos para programar um grupo de bezerras de 2,5 - 3,5 meses de idade selecionadas com base na observação laparoscópica de 225 folículos, antes do tratamento com FSH. A maturação e a fecundação *in vitro* resultaram em 19 ± 5 blastocistos, com uma taxa de blastocisto de 37% dos ovócitos recuperados. Os embriões transferidos resultaram em uma taxa de prenhez (aos 45 dias) de 50%, com uma média de 5,6 prenhezes por bezerra doadora. Houve perda embrionária de 30% e as prenhezes resultaram então em uma média de nascimento de 4 produtos por

doadora/OPU.

Earl *et al.* (1998), visando estimular o desenvolvimento folicular de bezerras de 1,5 a 2 meses de idade, administraram FSH e eCG (em única aplicação) e acrescentaram ainda a administração de LH para promover a maturação *in vivo* dos ovócitos. Com este tratamento foi obtida 43% de taxa de maturação ovocitária em relação ao número total de ovócitos recuperados. Malard *et al.* (2001a,b) utilizaram protocolo hormonal com dispositivo de progestágeno, e administração de FSH (dose única) e LH (18 horas antes da OPU) em bezerras Nelore de 2 a 3 meses de idade, não obtendo diferenças entre o grupo tratado e o controle com relação ao número de ovócitos obtidos.

Diversos tratamentos hormonais têm sido usados tanto em animais pré-púberes e pós-púberes com o objetivo de obter mais e melhores ovócitos para PIVE. Observa-se, porém, que bezerras requerem uma menor dose hormonal se comparadas aos animais adultos (TANEJA *et al.*, 2000), o que pode se dar devido simplesmente à uma menor massa corporal e/ou por uma melhor resposta ovariana (ARMSTRONG *et al.*, 1997). Em fêmeas adultas a utilização de FSH aumentou em média 60% a taxa de blastocistos na PIVE e, uma taxa de 80% foi observada após a administração de LH, seis horas antes do procedimento de aspiração folicular (BLONDIN *et al.*, 2002).

- Competência ovocitária

A competência ovocitária se refere à habilidade do ovócito para ser fecundado e desenvolver-se até um embrião em um determinado estágio e se completa até o embrião ser capaz de estabelecer uma prenhez que leve ao nascimento de um produto normal (ARMSTRONG *et al.*, 2001; SIRARD *et al.*, 2006). As etapas desta habilidade incluem a meiose, a clivagem a partir da fecundação para se desenvolver em um blastocisto, a indução da prenhez até gerar um produto saudável e, cada uma destas etapas são eventos que, uma vez concluídos, por si, não asseguram o sucesso da fase seguinte (SIRARD *et al.*, 2006).

O ovócito adquire competência sequencialmente ao longo do desenvolvimento folicular ovariano. Em fêmeas pós-púberes esta competência

do ovócito é atingida a partir do estágio final de crescimento do folículo pré-ovulatório. Isto se dá por influência da secreção em pico de hormônios gonadotróficos pela hipófise, particularmente pelo LH, disparada por um mecanismo de *feedback* positivo a partir do folículo maduro e que age sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário do animal (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Este processo de maturação pode ainda ocorrer espontaneamente quando os ovócitos são removidos de seus folículos, sendo que vários fatores podem interferir no sucesso da maturação, tais como a qualidade do ambiente folicular, tamanho do folículo de origem, morfologia do Complexo *Cumulus-Ovócito* (COC), condições de maturação e principalmente a competência ovocitária (DODE, 2006).

Nos bovinos, o ovócito começa a adquirir competência a partir dos 110-115 µm (FAIR *et al.* 1995 e OTOI, 1997), a partir da formação do antro folicular (HENDRIKSEN *et al.*, 2000), existindo uma correlação entre competência do ovócito, seu diâmetro e o tamanho do folículo do qual se originou. Caixeta *et al.* (2009), coletou e mensurou ovócitos de vacas obtidos de folículos com diferentes diâmetros e observou que folículos de 1,0-3,0mm continham ovócitos menores do que os de outras categorias (>3,1mm). Caixeta *et al.* (2009) verificaram, por exemplo, que folículos de 1-3mm apresentavam ovócitos de até 124µm e folículos maiores que 8,0 mm possuíam ovócitos com cerca de 129µm. Segundo Armstrong (2001), ovócitos provindos de bezerras são menos competentes comparados aos de adultos. O estudo realizado por Kauffold *et al.* (2005) demonstrou que o desenvolvimento da competência de ovócitos de bezerras taurinas de até dois meses de idade, também depende dos diâmetros dos folículos dos quais estes se originam. Estes autores relataram para bezerras Holandesas, que ovócitos provindos de folículos >8mm de diâmetro possuíam um maior potencial de desenvolvimento, se comparados aos de folículos médios e pequenos. Assim, ovócitos oriundos de folículos de maior diâmetro foram mais competentes que sua contraparte de folículos menores (CAIXETA *et al.*, 2009).

Considerando que a capacidade de se tornar blastocisto *in vitro* se dá quando o folículo atinge o diâmetro de 3mm, quando os ovócitos foram coletados a partir de folículos menores houve um comprometimento no progresso destes na PIVE (BLONDIN *et al.* 1995; 1997). Foi relatado que as taxas de clivagem e blastocisto foram maiores em embriões derivados de ovócitos isolados de folículos com diâmetro >6mm (CAIXETA *et al.* 2009) e a taxa de desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos de bezerras foi reduzida, quando comparada às taxas obtidas a partir de ovócitos de vacas (10-15% vs 30-40%; TANEJA *et al.*, 2000; OROPEZA *et al.*, 2004; ZARAZA *et al.*, 2010).

Kauffold *et al.* (2005) relataram que a utilização de ovócitos de animais pré-púberes, mesmo que coletados de folículos grandes, deveria ser melhor investigada, pois estudos demonstraram que mesmo obtendo-se blastocistos intactos, a taxa de sucesso após a transferência de embriões ainda foi baixa.

Diederich *et al.* (2012), demonstraram através de estudo com ovócitos de fêmeas pré-púberes e adultas, que o tratamento com FSH e IGF1 antes da OPU torna o estado epigenético do ovócito mais próximo ao de um ovócito de um animal adulto não tratado.

Gandolfi *et al.* (1998) concluíram que o diâmetro dos ovócitos em bezerras foi menor comparado ao de vacas ($118,04 \pm 1,15$ vs $122,83 \pm 0,74$ microns). Além disso, estes autores demonstraram diferenças no metabolismo de glutamina e piruvato durante a MIV (maturação *in vitro*) e na síntese de proteínas (mensurado através de [³⁵S] metionina e [³⁵S] cisteína), relacionando estes aspectos com a menor competência dos ovócitos.

1.5 Desenvolvimento folicular em *Bos taurus taurus* vs *Bos taurus indicus*

As fêmeas zebuínas, em média, apresentam um maior número de folículos ovarianos do que as taurinas, o que favorece o aumento da recuperação de ovócitos por coleta nestes animais (SENEDA *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2007; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Silva-Santos *et al.* (2011) avaliando cortes histológicos de ovários de fetos, de novilhas e de vacas *Bos*

taurus indicus vs *Bos taurus taurus*, concluiram que existe muita variação individual quanto ao número de folículos ovarianos e que a maior recuperação durante as coletas de ovócitos (OPUs) de zebuíños comparada a de taurinos não seria devido a uma maior reserva ovariana de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) naqueles animais. Os autores consideraram que esta diferença deveria estar relacionada a mecanismos de controle de desenvolvimento folicular que se dão após a fase pré-antral (folículos antrais, que compreendem os folículos terciários – sejam subordinados ou dominantes – e folículos pré-ovulatórios). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% de toda a população folicular (SILVA *et al.*, 2003) e durante o estágio de folículo pré-antral os ovócitos aumentam de volume, passando de cerca de 20 µm de diâmetro (folículo primordial) para aproximadamente 120 µm (folículo pré-ovulatório, SALHA *et al.*, 1998).

A maior recuperação de ovócitos em zebuíños é um dos fatores que justificam a liderança do Brasil na produção *in vitro* de embriões uma vez que, 80% de seu rebanho bovino (ABIEC, 2015), são representados por animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Apenas como estimativa de alguns resultados da PIVE em programas comerciais no Brasil, Pontes *et al.* (2011) avaliaram 656 OPUs (realizadas em 9 procedimentos com intervalos < 15 dias) em 317 vacas e novilhas doadoras Nelore, recuperando 20.848 ovócitos, sendo 75% destes viáveis (15.747) e produzindo 5.398 embriões transferidos que resultaram 36,57% (1.974) em prenhezes aos 30 dias e 33,12% (1.788) em prenhezes aos 60 dias. Assim, os autores observaram para cada OPU e/ou PIVE (média ± erro padrão da média), valores de $30,84 \pm 0,88$ ovócitos totais; $23,35 \pm 0,7$ ovócitos viáveis e $8,1 \pm 0,3$ embriões, que resultaram em $3,0 \pm 0,1$ prenhezes.

A maior parte dos estudos realizados em animais pré-púberes é feita em bezerras *Bos taurus taurus*, principalmente da raça Holandesa e, pela importância da subespécie *Bos taurus indicus* na atividade pecuária brasileira,

é necessário se conhecer melhor os aspectos reprodutivos também de bezerras zebuínas.

1.6 Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar as características ovarianas e a dinâmica folicular de bezerras Nelore (*Bos taurus indicus*), pré-púberes de 2 a 3 meses de idade.
- Avaliar um protocolo de tratamento hormonal (dispositivo de Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) sobre as características ovarianas e a OPU/PIVE de bezerras Nelore (*Bos taurus indicus*), de 4 a 7 meses de idade.

1.7 REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>, visualizada em: 11 de maio de 2015.

ANUALPEC. Anuário de Pecuária Brasileira, 2014, Instituto FNP, São Paulo.

ADAMS, G.P.; EVANS, A.C.O.; RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* v.100, p.27-33; 1994.

AERTS, J.M.; BOLS, P.E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod. Domest. Anim.* 45(1): 171-9, 2010.

ARMSTRONG, D.T.; HOLM, P.; IRVINE,B. et al. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, v.38, n.4, p.667-678, 1992.

ARMSTRONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropins stimulations regiments for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. *Theriogenology*, v. 42, p. 1227-1236, 1994.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, n.3, p.333-339, 1997.

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, Woodville, v. 55, p. 1303-1322, 2001.

BAO, B.; and GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J. Anim. Sci.** 76:1903-1921, 1998.

BATISTA, E.O.S.; MACEDO,G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SÁ FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma Antimullerian Hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, 2014.

BALDRIGUI, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Anti-mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murrah heifers compared to holstein and gyr kept under the same management. **Reproduction in Domestic Animals**, 2014.

BINELLI, M., PORTELA, V. M., MURPHY, B.D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.** Belo Horizonte, n.6, p.134-139, dez. 2009.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev.** 1995; 41: 54-62.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology** 1997;47:1061-1075.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.66, p.38- 43, 2002.

BURATINI, J.R.J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev.Bras.Reprod.Anim.** Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, 2007.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Reproduction in Domestic Ruminants III. J Reprod Fertil Suppl**, n.49, p.335-350, 1995.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; BURATINI JUNIOR, J.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression. In cumulus cells and oocytes of Bos indicus: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**. East Melbourne, V.21 p. 655-664. 2009.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biol. Reprod.**, v.37, p. 1054-1065, 1987.

DIEDERICH, M.I.; HANSMANN, T.; HEINZMANN, J.; BARG-KUES, B.; HERRMANN, D.; ALDAG, P.; BAULAIN, U.; REINHARD, R.; KUES, W.; WEISSBERGER, C.; HAAF, T. & NIEMANN, H. DNA methylation and mRNA expression profiles in bovine oocytes derived from prepubertal and adult donors. **Reproduction** 144 319–330, 2012.

D'OCCHIO, M. J., SUDHA, G., JILELLA, D., WHYTE, T., MACLELLAN, L. J., WALSH, J., TRIGG, T. E., MILLER, D. (1997) Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, 47:601-613.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: Anais do 21º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2006, Araxá. Araxá: SBTE; 2006. p.115-29.

EARL, C. R.; FRY, R. C.; MACLELLAN, L. J.; KELLY, J. M.; ARMSTRONG, D. T. In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. **Gametes: Development Functions**. Ed. Serono Symposia, Rome, 1998

ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod Fertil.**, v.10, 97-105, 1966a.

ERICKSON, B.H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **J. Anim. Sci**, 25:800-805, 1966b.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, 102, 463-470, 1994.

EVANS, N.P.; DAHL G.E.; MAUGER D.T.; PADMANABAHA V.; THRUN L.A., KARSCH F.J. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system? **Endocrinology**, v. 136, p. 5511-5519, 1995.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, Holderness, v. 42, p. 437-442, 1995.

UNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cell Endocrinol.** 163 (1-2): 53-60, 2000.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.135-163, 2003

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

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C.; BARROS, C.M. Dinâmica follicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 22, p. 201-210, 1999.

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

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A.M.; BREVINI, T.A.; ACOCELLA, F. Comparative analyses of calf and cow oocytes during in vitro maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.49, p.168-175, 1998.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Supression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifer continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol. of Reprod.** v.55, p. 68-74, 1996.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C.R.A.; BAYEUX, B.M.; DIAS, E.A.R.; MONTEIRO, F.M.; ACCORSI, M.; LOPES, R.N.V.R.; BARUSELLI, P.S. Plasma anti-mullerian hormone: na endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donos. **Domestic Animal Endocrinology** 49; 96-104, 2014.

GLISTER C, GROOME NP, KNIGHT PG. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. **J Endocrinol**, v.188, p. 215-225, 2006.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I. & WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in longterm culture in vitro. **Biology of Reproduction** 62 1322–1328, 2000.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** 7^a ed. São Paulo: Manole, p. 33 – 53, 2004.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS P.L.A.M. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000.

HULSHOF S.C.J., FIGUEIREDO J.R., BEKERS J.F., BEVERS M.M., VANDERSTICHELE H., VAN DEN HURK R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. **Theriogenology**, v.48, p.133-142, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –. Produção da Pecuária Municipal. ISSN 0101-4234, Rio de Janeiro – RJ, v. 38, p.1-65, 2010.

KAJIHARA, Y.; BLAKEWOOD, E. G.; MYERS, M.W. et al. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.220, 1991.

KAUFFOLD, J.; AMER, H.A.H.; BERGFELD, U.; MULLER, F.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. Offspring from non-stimulated calves at an age younger than two months: A preliminary report. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n.4, 2005.

LUSSIER JG, MATTON P, DUFOUR JJ, 1987: Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81, 301–307.

MALARD, P. F.; PEIXER, M. A. S.; MARQUES JUNIOR, A. P.; MCMANUS, C.; RUMPF, R. Potencial de desenvolvimento in vitro de embriões a partir de ovócitos de bezerras Zebu de 2 a 3 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, p. 418-419, 2001 a.

MALARD, P. F.; PEIXER, M. A. S.; MARQUES JUNIOR, A. P.; RUMPF, R. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n.6, p. 677-682, 2001 b.

MARTINS, C. F.; SIQUEIRA, L.G.B.; DODE M.A.N. Biotecnologia Aplicada a Pecuária Bovina. Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária. 1ed. Brasília: Embrapa,2011, v.1, p.655 -708.

MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **J Reprod Fertil Suppl**, 54:3-16, 1999.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; JUENGEL, J.L. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biol Reprod**, v.76, p.552-560, 2007.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; MINGOTI, G.Z. Controle do crescimento e da seleção follicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.35, n.4, p.418-432, out./dez. 2011.

OROPEZA, A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; HADELER, K.G.; NIEMANN, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. **Biol Reprod** 2004;70:1634-1643.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, S.; TACHIKAWA SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, Woodville, v. 48, n. 5, p. 769-774, out. 1997.

PONTES, J. H. F.; STERZA, F. A. M.; 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.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**; 29:21-37, 1988.

PRESICCE, G.A.; JIANG, S.; SIMKIN, M. *et al.* Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology of Reproduction**, v.56, n.2, p.386-392, 1997.

PRICE, C. A. (1999) Secreção pulsátil de LH alterada durante a superovulação em bovinos. In: XIV Reunião da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Anais... Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, supl. 27, p.35-53.

REIS, A.R.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA FILHO, B.D. Dinâmica follicular por ultrassonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** V. 13 (2) 51-55, 2005.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNETO, N.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Jornal of Reproduction and Fertility**, Tokyo, v. 103, p. 115-120, 1995.

RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in bos indicus heifers before and after nutritional anoestrous. **J Reprod Fertil**;104:41-9, 1995.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRIK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at differing ages. **Biol Reprod**, v.66, p.603-609, 2002.

SALHA, O.; ABUSHEIKA, N.; SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, p. 816-832, 1998.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; Produção in vivo e in vitro de embriões bovino In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 561-584. I, 2010.

SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v.124, n.3-4, p.244-250, abr. 2011.

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 Fertility** v. 83 p. 663–671, 1988.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained in vitro. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2000. Stockholm. Proceedings Sweden, 2000. p.62-65.

SILVA, J.R.V.; SILVA, A.F.; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A. P. R., FERREIRA M. A. L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 913-919, 2003.

SILVA J.R.V., THARASANIT T., TAVERNE M.A.M., VAN DER WEIJDEN G.C., SANTOS R.R., FIGUEIREDO J.R., VAN DEN HURK R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. **J Endocrinol**, v.189, p.113-125, 2006.

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

SIRARD, A.M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Woodville, v. 65, p. 126-136, 2006.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biol Reprod**; 39:308-317; 1988.

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; PEREIRA, C.P.; MALAGOLI JUNIOR, D.; RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-púberes da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **R. Bras. Zootec.** V.32, n.1, p.106-114, 2003.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VAN DE VELDE, A. *et al.* Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.206-213, 2000.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/lapotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, 42, p.227-238, 1996.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq Agrop Bras**, v.35, p.2501-2509, 2000.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 35. **Anais..**, Salvador: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p. 915-919. 2007.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Evolução no uso das técnicas de fertilização in vitro na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. **Acta Sci Vet**, v. 38, supl. 2, p. 323-334, 2010.

VOS, P. L. A. M., VAN DE LEEMPUT, E. E., ZEINSTRA, E. C., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J. (1996) Postponement of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of *in vivo* matured oocytes from eCG/PG superovulated heifers. **Theriogenology**, 45:329.

WANDJI, S.A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled insulin-like growth factor-I, ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, and ¹²⁵I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol Reprod** 47:814-822, 1992.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biol. of Reprod.**, v.55, p.942-948, 1996.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPIG, J.J. AND FORTUNE, J.E. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. **Hum. Reprod.**, 12, 1993±2001, 1997.

WRATHALL, J.H.; KNIGHT, P.G. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. **J Endocrinol**, v.145, p.491-500, 1995.

ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; VELAZQUEZ, M.A.; KORSAWE, K.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, 74, p.75-89, 2010.

2. CAPÍTULO 2¹ – DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM BEZERRAS NELORE (*Bos taurus indicus*) DE DOIS A TRÊS MESES DE IDADE

RESUMO - O objetivo do trabalho foi monitorar por ultrassom, durante 18 dias, a dinâmica folicular de 10 bezerras Nelore de 2-3 meses de idade. Os animais com até 2,25 meses de idade (n=4) apresentaram diâmetro máximo folicular $\leq 2,5\text{mm}$, portanto apenas os demais (n=6) continuaram sendo monitorados. Foram identificadas sucessivas ondas foliculares anovulatórias e cada onda apresentou um folículo dominante, além de um número variado de outros folículos com menores diâmetros (subordinados). Até três ondas de crescimento folicular anovulatórias foram detectadas por animal, durante o período avaliado, quando metade dos animais (n=3) apresentaram duas ondas e os demais (n=3) apresentaram três ondas. Considerando os dados agrupados (duas e três ondas), o comprimento da onda folicular foi de $9,2 \pm 2,0$ dias, e o folículo dominante correlacionado começou sua regressão aos $6,33 \pm 1,63$ dias após o dia da sua emergência. Os folículos dominantes tiveram uma taxa de crescimento de $0,23 \pm 0,06 \text{ mm/dia}$ e alcançaram diâmetro máximo de $3,03 \pm 0,17\text{mm}$. Apesar das bezerras Nelore avaliadas apresentarem ovários e diâmetros foliculares menores, o padrão de ondas foliculares e o número de folículos recrutados foram similares aos reportados em fêmeas Zebu, em atividade reprodutiva.

Palavras-chave: fêmeas pré-púberes, Nelore, ondas foliculares, ultrassonografia.

¹Artigo submetido e aprovado pela revista Animal Reproduction: *proofed version* anexo à dissertação

2.1 INTRODUÇÃO

O uso da ultrassonografia tem permitido uma melhor compreensão da dinâmica folicular ovariana em tempo real e de maneira não invasiva. Essa ferramenta tem ajudado a compreender mudanças fisiológicas, morfológicas e endócrinas no ciclo estral de fêmeas, incluindo o crescimento, a regressão dos folículos ovarianos e a ovulação, assim como as mudanças no corpo lúteo (CL; GINTHER *et al.*, 1989; KULICK *et al.*, 1999; KASTELIC, 1994; IRELAND *et al.*, 2000).

A população folicular no ovário bovino contém dois diferentes grupos de folículos, um “pool quiescente” (que contém folículos primordiais) e um “em crescimento” (folículos primários, secundários e terciários; KANITZ, 2001). Os ovários de uma bezerra recém-nascida podem conter mais de 100.000 folículos primordiais (ERICKSON, 1966). O padrão de crescimento folicular ocorre a partir do recrutamento folicular, que é a entrada dos folículos no grupo dos “em crescimento”, começando com a ativação do folículo primordial (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Adams *et al.* (1992) demonstraram que uma onda de FSH surge antes do recrutamento de cada onda em novilhas. O desenvolvimento dos folículos antrais na fêmea bovina ocorre no padrão de ondas de crescimento folicular, onde um folículo (folículo dominante – FD) cresce mais que os outros (folículos subordinados), e pode subsequentemente sofrer atresia ou ovular (em fêmeas pós-púberes), tanto em raças europeias (*Bos taurus taurus*; PIERSON & GINTHER, 1988; DRIANCOURT, 2001) como nas indianas (*Bos taurus indicus*; RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000; SARTORI & BARROS, 2011).

Entre os mecanismos descritos para explicar a ocorrência de folículos dominantes e subordinados é que o FD muda sua dependência de FSH para LH, continuando a crescer mesmo durante a privação de FSH em detrimento de outros folículos, que interrompem seu crescimento e entram em atresia (subordinados; GINTHER *et al.*, 1996). Apesar das gonadotrofinas (FSH e LH) desempenharem um papel endócrino primário no desenvolvimento folicular, fatores locais também interferem nesse processo como a inibina e o IGF-1

(Fator de crescimento semelhante à insulina – 1). Secreção de inibina pelo FD, por um feedback negativo, diminui a secreção de FSH, desempenhando um importante papel no recrutamento e desenvolvimento folicular (TURZILLO & FORTUNE, 1993). Outros fatores, como ativina e folistatina também podem estar envolvidos nestes mecanismos (Hulshof *et al.*, 1997; Glister *et al.*, 2006).

Apesar da sua puberdade mais tardia (HAFEZ & HAFEZ, 2004), relatos descrevem um melhor recrutamento folicular em fêmeas Zebu do que em taurinas ($33,4 \pm 3,3$ vs $25,0 \pm 2,5$ respectivamente; CARVALHO *et al.*, 2008 e $39,0 \pm 4,0$ vs $21,0 \pm 4,0$; ALVAREZ *et al.*, 2000). Adicionalmente, é descrito que o diâmetro máximo folicular em vacas Zebu (10-13 mm; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2007) é menor que os reportados em taurinos (16-20 mm; GINTHER *et al.*, 1989; KASTELIC, 1994; IRELAND *et al.*, 2000), ambos em fêmeas pós-púberes.

Esses padrões de ondas foliculares aparecem tanto em fêmeas pós-púberes (dois ou três ondas até a ovulação) como em pré-púberes (crescimento contínuo de folículos, sem ovulação; ADAMS *et al.*, 2008). Esta contenção da atividade reprodutiva pela ausência de ovulação em fêmeas bovinas, ovinas e ratais pré-púberes deve-se à inibição da atividade reprodutiva por uma maior sensibilidade do hipotálamo ao Estradiol (RAMIREZ & MCCANN 1963; RAMIREZ & SAWYER, 1965; DAY *et al.*, 1987), resultando no *feedback* negativo sobre essa estrutura.

Silva-Santos *et al.* (2011) avaliando cortes histológicos de ovários de fetos, de novilhas e de vacas *Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*, concluiram que existe muita variação individual quanto ao número de folículos ovarianos de zebuínos quando comparado ao de taurinos. Ainda a partir de cortes e observação de ovários de bezerras, Erickson (1966) relatou que, logo após o nascimento, poucos folículos antrais podem ser visualizados macroscopicamente (7 ± 2), porém este número começa a aumentar a partir dos dois meses de idade (49 ± 10). Observou ainda que, esta quantidade tende a diminuir aos oito meses (33 ± 9). Adams *et al.* 1994, acompanharam fêmeas *Bos taurus taurus* pré-púberes de 9 meses de idade e observaram padrão de

duas ondas de crescimento folicular em intervalo aproximado de 18 dias. Evans *et al* (1994) estudando a dinâmica folicular e a secreção de gonadotrofinas em dez bezerras Hereford (*Bos taurus taurus* de 0,5 a 9 meses de idade) observaram maiores diâmetros máximos dos folículo dominantes e dos maiores subordinados em animais entre 0,5 e 2 meses de idade. Verificou também que há um aumento nas concentrações de gonadotrofinas séricas em bezerras de 1 a 3,5 meses de idade. Este estudo objetivou avaliar, por ultrassonografia, a dinâmica folicular em bezerras Nelore (*Bos taurus indicus*) de dois a três meses de idade.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Localização e período do ano

Este estudo foi realizado no Campo Experimental Fazenda Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília-DF, localizada a 15°52' a 150 56'S e 48°00' a 48°02'W, com altitudes entre 1.050 e 1.250 m e clima tropical. Este campo experimental tem área aproximada de 1.800 ha ocupada por vegetação nativa do bioma Cerrado, bem como por áreas antropizadas com agricultura e pastagens.

Esse experimento foi realizado de Junho à Julho de 2014, durante o período de inverno.

2.2.2 Animais

Este estudo foi submetido e aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste – Protocolo 21192 nº 000264/2013-56). Dez bezerras Nelore (de dois a três meses de idade), lactentes, foram mantidas com suas respectivas mães e com disponibilidade de água *ad libitum*. O peso corporal dos animais variou de 55 até 100kg e estes apresentavam o escore de condição corporal (ECC) de 3 (escala de 0 a 5, MACHADO *et. al.* 2008).

2.2.3 Exames ultrassonográficos e registro dos dados

Os ovários de cada bezerra foram monitorados por ultrassonografia transretal utilizando um transdutor linear de 7,5 MHz (Aloka 500. *Aloka CO. Ltd. Tokyo Japan*) conectado à um adaptador rígido de policloreto de vinila (PVC) com aproximadamente 40 cm de comprimento e diâmetro compatível ao encaixe da *probe*.

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas diariamente pelo mesmo operador por 18 dias (como descrito por ADAMS *et al.*, 1994; EVANS *et al.*, 1994). As imagens dos ovários foram identificadas e congeladas quando necessário, e os seus diâmetros foram mensurados em cada animal pela média entre o diâmetro máximo longitudinal e perpendicular. A média global do diâmetro máximo dos ovários foi obtida pela soma do diâmetros máximos dos ovários de cada animal, dividido pelo número total de animais.

Os folículos foram identificados, contados e mensurados da mesma maneira descrita para os ovários. Os dados foram anotados em diagramas visando registrar o número, tamanho, posição relativa dos folículos nos ovários, qualidade da imagem, horário do exame, identificação do animal, entre outras informações. Somente folículos $\geq 2\text{mm}$ foram mensurados e anotados. Diariamente, todos os folículos $\geq 2\text{mm}$ de diâmetro foram contados.

O dia da emergência de cada onda foi definido como o primeiro dia da detecção do folículo dominante $\geq 2\text{mm}$ de diâmetro. As ondas foliculares foram monitoradas desde o dia de sua emergência, até a sua regressão para o tamanho inicial ($FD \geq 2\text{mm}$ de diâmetro) e assim sucessivamente para as demais ondas. O comprimento da onda foi obtido pela subtração do dia da detecção do FD, do ultimo dia em que o FD foi detectado ($\geq 2\text{mm}$), em cada onda.

O início da atresia de cada onda foi considerado o dia imediatamente anterior ao dia em que o diâmetro do FD foi menor que o mensurado anteriormente, contado a partir do dia de detecção de cada onda. As ondas foliculares foram designadas como primeira, segunda e terceira onda, detectadas durante o período de observação. O intervalo entre ondas foi

definido como o número de dias entre sucessivas emergências de folículos dominantes. A taxa de crescimento do FD de cada onda foi obtido pela subtração do menor diâmetro do FD ($\geq 2\text{mm}$) do maior diâmetro do FD, dividido pelo número de dias do período de crescimento.

Durante a ultrassonografia diária dos animais ($n=10$) verificou-se que alguns destes ($n=4$, com idade $\leq 2,25$ meses) apresentaram folículos com diâmetro $\leq 2,5$ mm. Assim, apenas os demais animais ($n=6$) tiveram suas ondas foliculares monitoradas.

2.2.4 Análise de dados

Para cada onda foi realizada uma análise descritiva (Média \pm Desvio Padrão – DP) para cada uma das seguintes características: Diâmetro máximo do FD (mm), Início da Atresia do FD (dia), Taxa de crescimento do FD (mm/dia), Comprimento da onda (dias) e Intervalo entre ondas (IEO, dias). A Média \pm DP também foi obtida para Diâmetro máximo dos ovários e número de folículos detectados, concluindo a análise descritiva.

O teste de Mann-Whitney (programa PROPHET, versão 5.0; BBN Systems and Technologies, 1997) foi utilizado para comparar bezerras que apresentaram três ondas ($n=3$) com bezerras que apresentaram duas ondas foliculares ovarianas, durante o período de observação.

2.3 RESULTADOS

Bezerras de 1 a 2,25 meses de idade ($n=4$) apresentaram diâmetro máximo do folículos $\leq 2,5$ mm e, consequentemente não foram utilizadas para os registros de ondas foliculares. Nos demais animais ($n=6$), um padrão de sucessivas ondas foliculares anovulatórias foi observado, incluindo um folículo dominante (FD) e um número variável de outros folículos menores (subordinados) por onda. Durante 18 dias consecutivos, metade dos animais ($n=3$) apresentou duas ondas, e a outra metade apresentou três ondas de crescimento folicular.

O diâmetro máximo dos ovários foi $13,6 \pm 0,6$ mm contendo $31,4 \pm 3,45$ folículos visíveis ao ultrassom (Tabela 2.1). O intervalo entre ondas ondas foi de $5,55 \pm 2,55$ dias ($n=9$ ondas).

Mesmo as bezerras ($n=3$) que apresentaram um maior número de ondas (três ondas) tiveram um IEO semelhante aos animais que apresentaram duas ondas ($4,66 \pm 2,08$ vs $7,0 \pm 1,0$; $p=0,795$; respectivamente para animais com três e duas ondas).

O diâmetro máximo do folículo dominante foi $3,03 \pm 0,17$ mm ($n = 15$ ondas), que teve taxa de crescimento de $0,23 \pm 0,06$ mm/dia ($n = 15$ ondas), e o início de sua atresia ocorreu no dia $6,33 \pm 1,63$ após o início da detecção de cada onda folicular ($n = 15$ ondas, Tabela 2.1). O comprimento da onda foi de $9,2 \pm 2,0$ dias ($n = 15$ ondas) e o Intervalo entre ondas foi de $5,55 \pm 2,55$ dias ($n = 9$ ondas, Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Características dos ovários e ondas foliculares apresentadas na ultrassonografia de bezerras Zebu.

Características Ovarianas/Foliculares	Valores*
Diâmetro máximo dos ovários (mm; $n = 12$ ovários)	$13,6 \pm 0,6$
Número de folículos ≥ 2 mm detectados ($n = 6$ animais)	$31,4 \pm 3,45$
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm; $n = 15$ ondas)	$3,03 \pm 0,17$
Taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia; $n = 15$ ondas)	$0,23 \pm 0,06$
Comprimento da onda (dias; $n = 15$ ondas)	$9,2 \pm 2,0$
Início da atresia do folículo dominante (dia; $n = 15$ ondas)	$6,33 \pm 1,63$
Intervalo entre ondas (dias; $n = 9$ ondas)	$5,55 \pm 2,55$

*Média \pm DP (desvio padrão).

Para ilustrar a dinâmica do folículo dominante e dos maiores folículos subordinados, durante o período de observação, gráficos de bezerras de $2,7 \pm 0,33$ meses de idade ($n=6$) estão representadas nas Figuras 2.1 a 2.6.

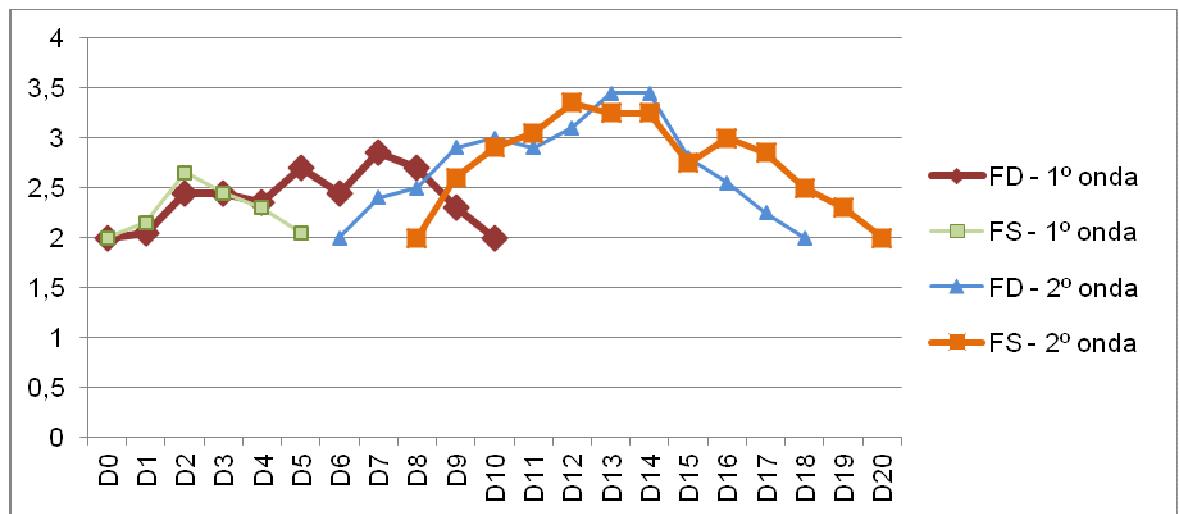


Figura 2.1 - Dinâmica folicular em bezerra de 3 meses de idade.

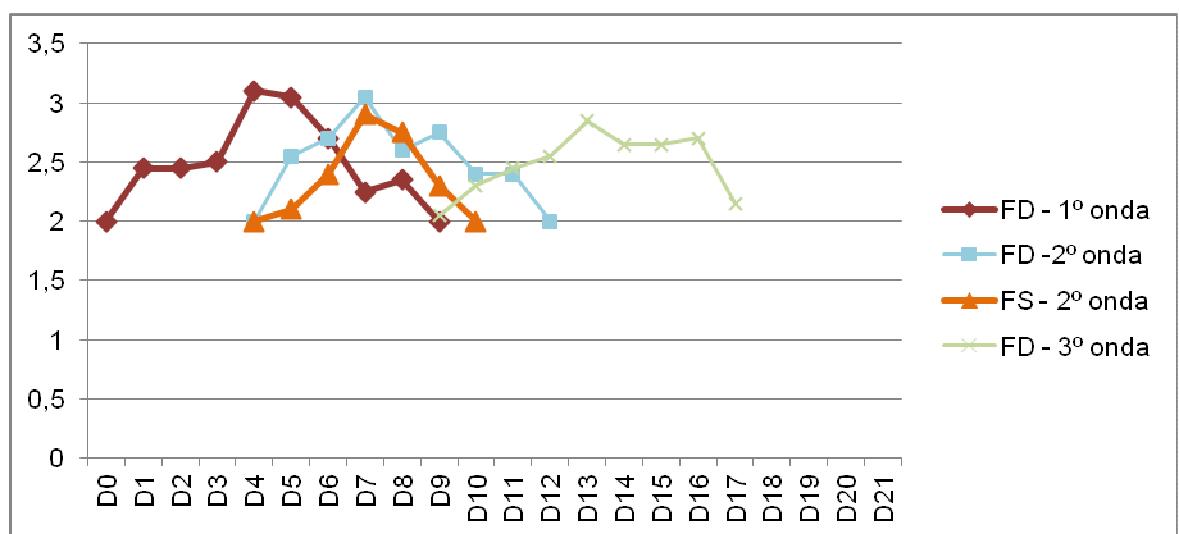


Figura 2.2 - Dinâmica folicular em bezerra de 3 meses de idade.

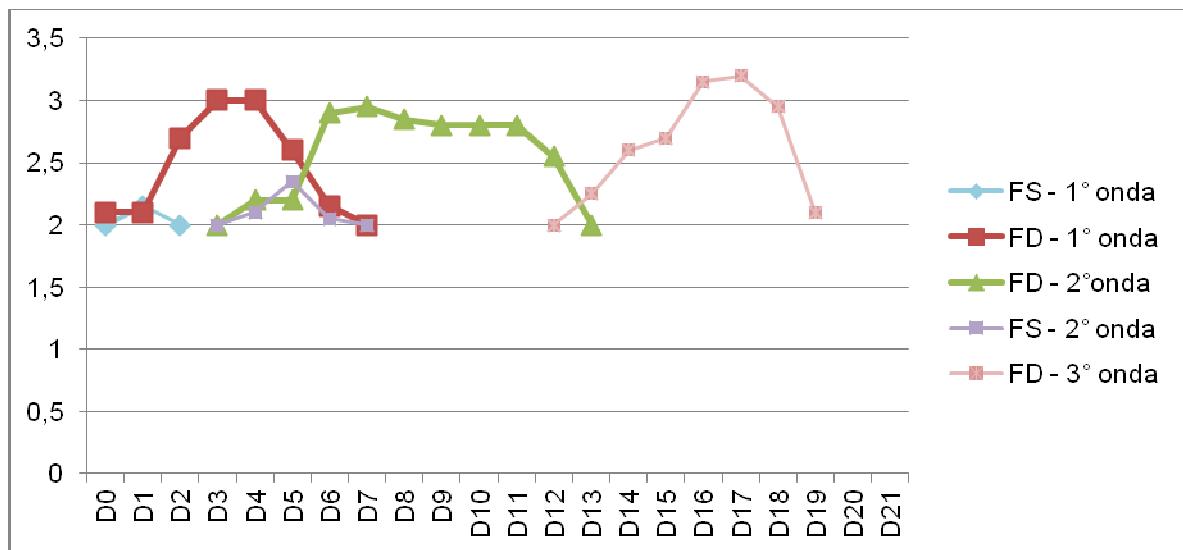


Figura 2.3 - Dinâmica folicular em bezerra de 3 meses de idade.

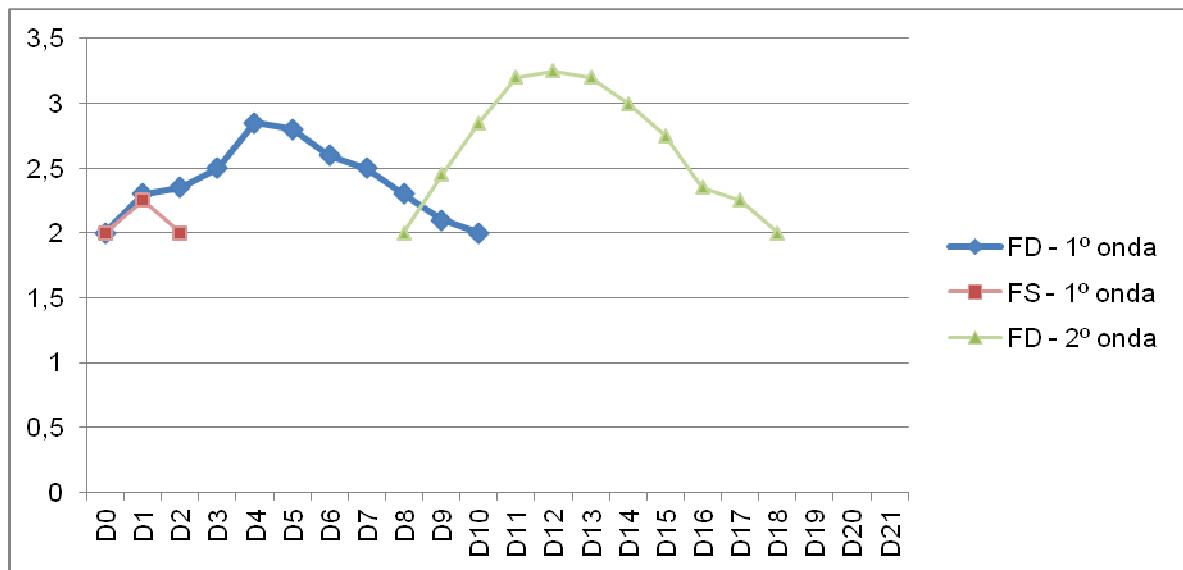


Figura 2.4 - Dinâmica folicular em bezerra de 2,5 meses de idade.

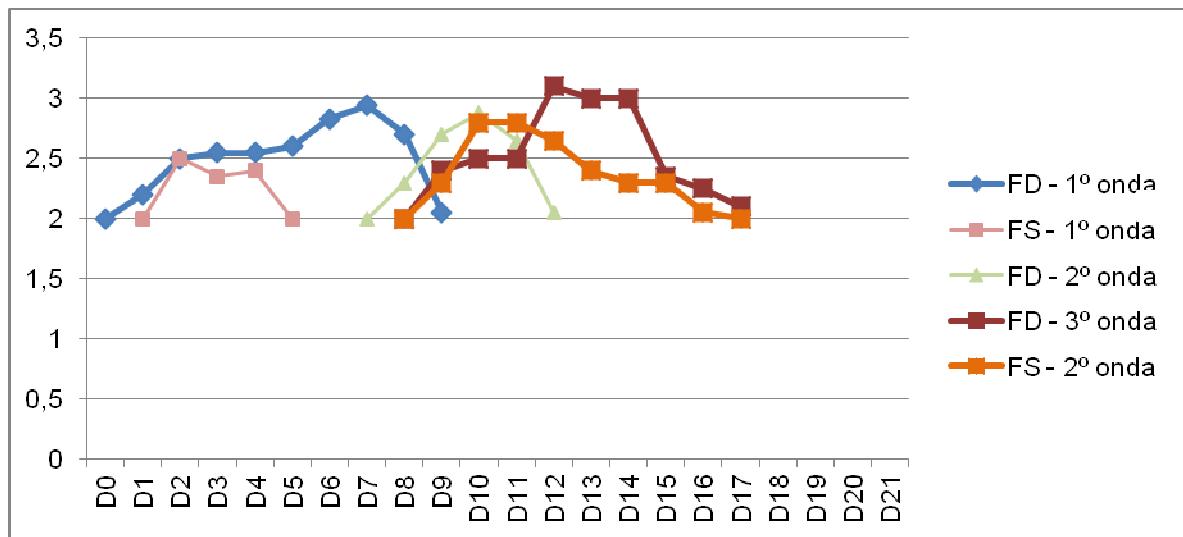


Figura 2.5 - Dinâmica folicular em bezerra de 2,25 meses de idade.

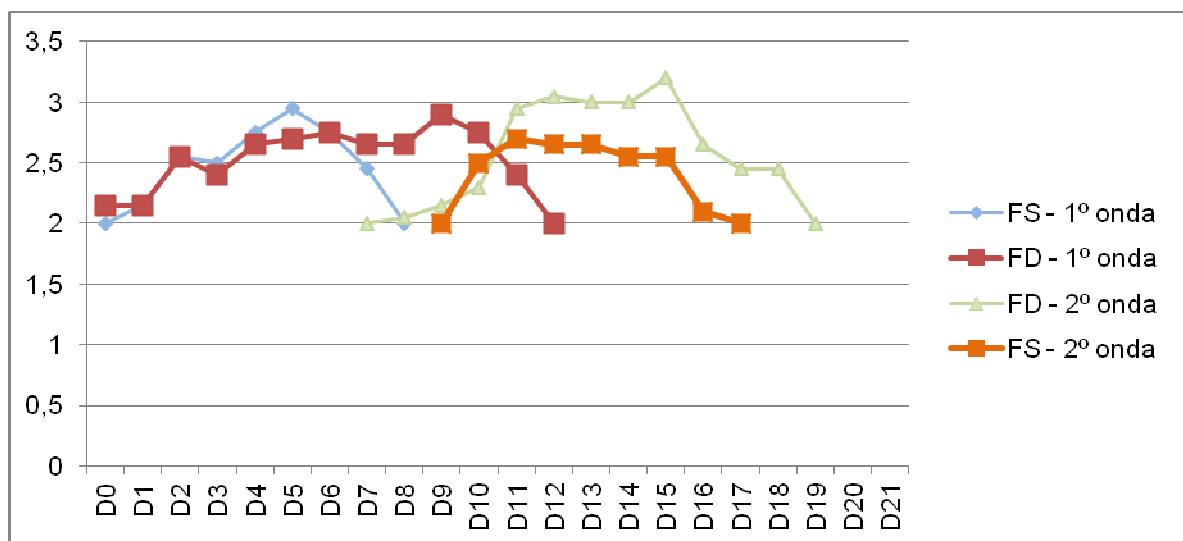


Figura 2.6 - Dinâmica folicular em bezerra de 2,5 meses de idade

2.4 DISCUSSÃO

O fato de bezerras *Bos taurus indicus* com menos de 2,25 meses de idade ($n=4$) neste estudo não terem apresentado folículos maiores que 2,5 mm de diâmetro, corrobora com o estudo de Erickson (1966), que demonstrou que bezerras (*Bos taurus taurus*) começam a apresentar um maior número de folículos antrais a partir dos dois meses de idade. Entretanto, Kauffold *et al.* (2005) realizaram aspiração folicular em bezerras *Bos taurus taurus* (<2 meses

de idade) e esses animais apresentaram diâmetro folicular >8 mm. O início da atividade reprodutiva ou mesmo alguns períodos antes desse estágio podem ser influenciados por diversos fatores (clima, nutrição, manejo, raça). Além disso, existem particularidades entre vacas Zebu que usualmente iniciam sua atividade reprodutiva mais tarde, se comparadas às taurinas (RANDEL, 2005). Entretanto, além dessas particularidades entre subespécies, outros fatores podem influenciar a população folicular e características foliculares (IRELAND *et al.*, 2008, 2011). Variações entre indivíduos da mesma raça, ou idade, por exemplo, podem ocorrer em propriedades diferentes. Apesar desta variação, sabe-se que a repetibilidade na contagem de folículos é mantida no mesmo animal. Assim, alguns desses fatores, isolados ou em conjunto, podem ter determinado o momento em que as bezerras avaliadas começaram a apresentar folículos maiores.

O padrão de sucessivas ondas foliculares ovarianas observadas nesta avaliação em bezerras de $2,7 \pm 0,33$ meses de idade corrobora com os dados descritos em *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* tanto em dinâmica folicular de fêmeas pós-púberes (PIERSON & GINTHER, 1988, RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 2000; SARTORI & BARROS, 2011) quanto em pré-púberes (EVANS *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2008). O mesmo se observou em relação à presença do folículo dominante e de um número variável de folículos subordinados, que poderia ser explicado a partir da suposta secreção de Inibina pelo folículo dominante, que diminuiria a secreção sérica de FSH (TURZILLO & FORTUNE, 1993). Trabalhos relatam que, em fêmeas pós-púberes, a dominância se dá ainda pela mudança de dependência do folículo dominante de FSH para LH, que continuaria a crescer mesmo durante a privação de FSH em detrimento dos demais folículos (GINTHER *et al.*, 1996).

Era esperado ainda que as ondas observadas fossem anovulatórias em função de determinado bloqueio na secreção de GnRH no hipotálamo de fêmeas pré-púberes, que consequentemente limitaria picos de FSH e LH suficientes para promover o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios e a

consequente ovulação destes (RAMIREZ & MCCANN, 1963; RAMIREZ & SAWYER, 1965, DAY *et al.*, 1987 e ADAMS *et al.*, 2008). Esta mesma razão pode também explicar o fato do diâmetro máximo dos folículos dominantes das bezerras ($3,03 \pm 0,17$ mm) ser menor do que os relatados para fêmeas zebuínas pós-púberes (10 a 13 mm, FIGUEIREDO *et al.*, 1997, SARTORELLI *et al.*, 2005 e CASTILHO *et al.*, 2007) e consequentemente o diâmetro máximo dos ovários também ter sido menor (13,6 mm vs 27,2 mm, deste estudo vs dados descritos por CARVALHO *et al.*, 2008, respectivamente) por conter folículos menores, bem como pela ausência de CL.

A quantidade total de folículos (≥ 2 mm) observada nos ovários das bezerras avaliadas ($31,4 \pm 3,45$) foi semelhante à relatada para fêmeas zebuínas adultas ($33,4 \pm 3,3$; CARVALHO *et al.*, 2008 e $39,0 \pm 4,0$ ALVAREZ *et al.*, 2000) e foi maior do que às relatadas para fêmeas taurinas adultas ($25,0 \pm 2,5$; CARVALHO *et al.*, 2008 e $21,0 \pm 4,0$; ALVAREZ *et al.*, 2000), ou pré-púberes de 3,5 meses de idade ($19,4 \pm 2,1$; EVANS *et al.*, 1994). Essa ocorrência pode ser explicada pelo fato dos animais pertencerem à raça Nelore, que desenvolvem maior população folicular total por onda que os taurinos.

A taxa de crescimento do folículo dominante dos animais deste estudo foi de $0,23 \pm 0,06$ mm/dia; ou seja, menor que a relatada em vacas (0,92 mm/dia raça Nelore, FIGUEIREDO *et al.*, 1997; e 1,6mm/dia em taurinos, SIROIS & FORTUNE, 1988), provavelmente devido à menor pulsatilidade de LH nas bezerras, quando comparadas à de fêmeas adultas (Evans *et al.*, 1994).

O comprimento da onda nas bezerras avaliadas ($9,2 \pm 2,0$ dias) foi semelhante à descrita por Evans *et al.* (1994; $11,6 \pm 1,3$ dias) em bezerras *Bos taurus taurus* de dois meses de idade (raça Hereford) e por Reis *et al.* (2005), em novilhas Zebu pré-púberes de 22 meses de idade (raça Gir), que relataram ainda que 12% dos animais apresentaram ondas foliculares de até 12 dias e cerca de 88% dos animais tiveram um comprimento de onda de 13 a 17 dias. Semelhantes comprimentos de onda foram descritos também por outros

autores em fêmeas Zebu (SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008).

O início da atresia dos folículos dominantes das bezerras monitoradas ocorreu a partir do dia $6,33 \pm 1,63$, o que é similar ao descrito em novilhas pré-púberes de 22 meses de idade por Reis *et al.* (2005; dia $7,4 \pm 0,3$; Gir), Adams *et al.* (1994; por volta do dia 8; em novilhas Hereford de 8 meses de idade) e Evans *et al.* (1994; por volta do dia 5 em bezerras Hereford de um mês de idade) e em fêmeas Nelore pós-púberes, relatado por Figueiredo *et al.* (1997; dia $8,86 \pm 0,5$).

Concluindo, apesar das bezerras Nelore apresentarem diâmetros ovarianos e foliculares menores comparados aos estudos em fêmeas pós-púberes; o padrão de ondas foliculares e o número de folículos recrutados foram semelhantes aos reportados em fêmeas Zebu em atividade reprodutiva. Esse dados podem caracterizar um momento importante no desenvolvimento reprodutivo inicial desses animais.

2.5 REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J.; 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, 94:177-188.
- ADAMS, G.P.; EVANS, A.C.O.; RAWLINGS, N.C. 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **J Reprod Fertil**, 100:27-33.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, 69:72-80.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, J.R.C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim Sci**, 78:1291-1302.

CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; 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**, 69:167-175, 2008.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F. 2007. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Anim Reprod Sci**, 98:189-196.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biol Reprod**, 37:1054-1065.

DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, 55:1211-1239.

ERICKSON, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J Anim Sci**, 25:800-805.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J Reprod Fertil**, 102:463-470.

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

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

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, 55:1187-1194.

GLISTER C, GROOME NP, KNIGHT PG. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. **J Endocrinol**, v.188, p. 215-225, 2006.

HULSHOF S.C.J., FIGUEIREDO J.R., BEKERS J.F., BEVERS M.M., VANDERSTICHELE H., VAN DEN HURK R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. **Theriogenology**, v.48, p.133-142, 1997.

IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **J Dairy Sci**, 83:1648-1658.

IRELAND, J.L.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMHEN, A.P.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.J. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol Reprod**, 79:1219-1225.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. 2011. 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. **Reprod Fertil Dev**, 23:1-14.

KANITZ, W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. **Arch Anim Breed**, 44:p.9-23.

KASTELIC, J.P. 1994. Understanding ovarian follicular development in cattle. **Vet Med**, 6:64-71.

KAUFFOLD, J.; AMER, H.A.H.; BERGFELD, U.; MULLER, F.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. 2005. Offspring from non-stimulated calves at an age younger than two months: a preliminary report. **J Reprod Dev**, v.51:427-432.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, 52:913-921.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA R. T.; BERGAMASHI, M. A. C. M. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. Circular técnica, Embrapa, 57. São Carlos, dez/ 2008.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; MINGOTI, G.Z. 2011. Controle do crescimento e da seleção follicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Rev Bras Reprod Anim**, 35:418-432.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, 29:21-37.

RAMIREZ, V.D.; MCCANN, S.M. 1963. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult. **Endocrinology**, 72:452-464.

RAMIREZ, V.D.; SAWYER, C.H. 1965. Advancement of puberty in the female rat by estrogen. **Endocrinology**, 76:1158-1168.

RANDEL, R.D. 2005. Reproduction of *Bos indicus* breeds and crosses. In: Proceedings. **Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**, 2005, College Station, TX. College Station, TX: Texas A&M University. 20 pp.

REIS, A.R.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA FILHO, B.D. 2005. Dinâmica follicular por ultrassonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Arch Latinoam Prod Anim**, 13:51-55.

RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DE'ATH, G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **J Reprod Fertil**, 104:41-49.

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

SARTORI, R.; BARROS, C.M. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, 124:244-250.

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

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol Reprod**, 39:308-317.

TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. 1993. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. **J Reprod Fertil**, 98:113-119.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq Agrop Bras**, 35:2501-2509.

3. CAPÍTULO 3 – MANIPULAÇÃO HORMONAL EM BEZERRAS NELORE VISANDO A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

RESUMO - A busca de manejos reprodutivos que possibilitem a inclusão de fêmeas bovinas pré-púberes na produção *in vitro* de embriões (PIVE) pode permitir uma aceleração do ganho genético do rebanho pela diminuição do intervalo entre gerações. Neste estudo se avaliou a atividade de uma manipulação hormonal sobre as características ovarianas e sobre a *Ovum Pick Up* (OPU)/PIVE de bezerras Nelore, de 4 a 7 meses de idade. Este tratamento (Grupo Tratado-GT, n=9 em delineamento cross-over. Dispositivo de Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) promoveu aumento na população folicular total ($20,0 \pm 4,95$ em D0 vs $26,66 \pm 4,24$ em D7), de folículos $\geq 2,5\text{mm}$ ($4,11 \pm 1,96$ em D0 vs $11,55 \pm 4,09$ em D7), do diâmetro ovariano ($13,08 \pm 1,0$ mm, em D0 vs $14,81 \pm 1,38$ mm em D7) e do número de folículos aspirados (95 vs 152, respectivamente para Grupo Controle-GC; n=9 e GT). Porém, este não aumentou a taxa de clivagem das estruturas avaliadas (49,33 vs 51,42, respectivamente para GC e GT), assim como o número de blastocistos em D7 (3 vs 9, respectivamente para GC e GT) e o número de embriões por fêmea doadora (0,33 vs 1,0, respectivamente para GC e GT). Concluiu-se que o tratamento hormonal avaliado aumentou número de folículos observados e aspirados, mas não se verificou a viabilização da PIVE pelo seu uso.

Palavras-chave: estimulação hormonal, fêmeas pré-púberes, *Ovum Pick Up*, PIVE.

3.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução animal assistida (TRA) na bovinocultura têm sido aprimoradas acentuadamente nas últimas décadas e tem representado uma importante contribuição ao melhoramento genético animal. No Brasil, a produção in vitro de embriões (PIVE) evoluiu de forma significativa, a ponto do país se tornar líder mundial desta atividade (RUMPF, 2007; VIANA & CAMARGO, 2007). A PIVE possibilita a utilização de material genético oriundo de diversos tipos de animais como vacas com subfertilidade adquirida, fêmeas mortas accidentalmente, além da utilização de ovócitos oriundos de ovários de abatedouro e de animais fora da idade reprodutiva, pré ou pós-púberes (SARTORI *et al.*, 2010).

A inclusão de fêmeas pré-púberes na PIVE pode diminuir o intervalo de gerações, sendo um fator potencial para acelerar o ganho genético do rebanho (LOHUIS, 1995). Apesar de não se conhecer o desempenho reprodutivo real de bezerras, estudos podem sugerir esse desempenho com maior ou menor precisão, como a diferença esperada da progênie (DEP) interina, observando-se as características dos pais e de grupo de contemporâneos (BRINKS, 1990); ou mesmo através de avaliações genômicas. Além disso, autores (GUERREIRO *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2014; BALDRIGHI *et al.*, 2014), relataram que o estudo do hormônio antimülleriano (AMH) também pode estimar a qualidade reprodutiva dos animais, principalmente com relação à PIVE.

Porém, estudos indicam que ovócitos provindos de bezerras são menos competentes comparados aos de animais adultos, sugerindo uma deficiência no citoplasma ovocitário (LEVESQUE & SIRARD *et al.* 1994; ARMSTRONG, 2001; SALAMONE *et al.* 2001). Estudo realizado em bezerras por Erickson *et al.* (1966) demonstra que o número de folículos antrais começa a aumentar a partir de aproximadamente dois meses de idade (49 ± 10), e esse número sofre um período de queda após os oito meses (33 ± 9). Em contrapartida, dados obtidos por Presicce *et al.* (1997) em bezerras holandesas de 9 a 11 meses, sugerem que a competência ovocitária aumenta conforme a idade, já que nesta

faixa etária os embriões obtidos apresentaram desenvolvimento para os estágios mórula e blastocisto, semelhantes aos de fêmeas pós-púberes.

Os folículos pré-antrais representam 90% de toda população folicular ovariana (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011) e, durante este estágio folicular, os ovócitos aumentam de volume, de cerca de 20 μ m de diâmetro (folículo primordial) para aproximadamente 120 μ m (folículos pré-ovulatório; SALHA *et al.*, 1998). Em vacas, o ovócito começa a adquirir competência a partir de 110-115 μ m (FAIR *et al.* 1995; OTOI, 1997). Estudos avaliam que há uma correlação entre a competência do ovócito e o tamanho do folículo do qual este se originou. Assim, Caixeta *et al.* (2009), estudando ovários de vacas adultas oriundos de abatedouro, descreveram que ovócitos recuperados de folículos >6mm apresentaram maior competência comparados àqueles obtidos de folículos de menor tamanho. Lonergan *et al.* (1994), semelhantemente, demonstraram que os ovócitos recuperados destes folículos também apresentaram uma maior proporção de blastocistos. Este fato também foi observado para ovócitos obtidos de bezerras holandesas (2 a 3 meses de idade), nas quais foi demonstrado que folículos >8mm, apresentaram um melhor desempenho na PIVE quando comparados aos obtidos de folículos menores, como melhor taxa de clivagem (89,5% vs 74,1% para grupos de animais com folículos >8 mm e de 4 - 8mm, respectivamente), maior quantidade de embriões com mais de quatro células (78,9% vs 37,0% para grupos de animais com folículos >8 mm e de 4 - 8mm, respectivamente), maior porcentagem de mórulas e blastocistos em D7 (68,4% vs 27,8% para grupos de animais com folículos >8 mm e de 4 - 8mm, respectivamente. KAUFFOLD *et al.*, 2005).

Visando melhorar a viabilidade dos ovócitos obtidos de animais pré-púberes para uso na PIVE, autores (ARMSTRONG *et al.* 1992, 1994; PRESICCE *et al.* 1997; MALARD *et al.* 2001; TANEJA *et al.* 2000; SNEL-Oliveira *et al.* 2003) propuseram a utilização da estimulação ovariana, por meio de protocolos utilizando hormônios gonadotróficos. De modo geral, busca-se mimetizar, em parte, as condições hormonais de uma fêmea pós-púberes.

(ex: presença de hormônios ou de análogos de progesterona, estradiol, FSH e LH em doses e regimes de oferta controlados) pelo uso de um protocolo hormonal nas fêmeas pré-púberes, visando aumentar a quantidade e a competência ovocitária para viabilizar a PIVE nestes animais. Vários destes protocolos foram testados, porém, os efeitos obtidos ainda são pouco conclusivos, devido a grande variação de resultados (ARMSTRONG *et al.* 1992, 1994; PRESICCE *et al.* 1997; MALARD *et al.* 2001; TANEJA *et al.* 2000; SNEL-OLIVEIRA *et al.* 2003). A utilização de um progestágeno associado ao Benzoato de Estradiol permite que, a partir da atresia do folículo dominante, uma nova onda de crescimento folicular seja iniciada (COLAZO *et al.*, 1999; BO *et al.*, 2000). O emprego do FSH nestes protocolos contribui para estimular o crescimento e a maturação do folículo ovariano (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Já o LH, em níveis basais, atua em conjunto com o FSH induzindo a secreção de estrógenos do folículo ovariano desenvolvido (HAFEZ & HAFEZ, 2004) e, quando em picos endógenos ou exógenos, pode induzir a maturação *in vivo* de ovócitos em folículos responsivos, em um intervalo apropriado antes da OPU.

Outra variação encontrada nos estudos foram os métodos para viabilizar a aspiração folicular (*ovum pick up* ou OPU), visando à obtenção dos ovócitos em bezerras. Dentre eles estão a laparotomia (MALARD *et al.* 2001); laparoscopia (ARMSTRONG *et al.* 1994; TANEJA *et al.* 2000; KAUFFOLD *et al.* 2005) e, em novilhas pré-púberes, por meio da punção folicular transvaginal guiada por ultrassom (SNEL-OLIVEIRA *et al.* 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar um protocolo hormonal de estimulação ovariana utilizando gonadotrofinas (FSH e LH), Benzoato de Estradiol e Progesterona, em bezerras da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com 4 a 7 meses de idade, visando a PIVE.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Localização

O estudo foi realizado no Campo Experimental Fazenda Sucupira (CEFS) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situada em Brasília-DF (localizada a 15°52' a 150° 56'S e 48°00' a 48°02'W, com altitudes entre 1.050 e 1.250m e clima tropical). Este campo experimental tem área aproximada de 1.800 ha ocupada por vegetação nativa do bioma Cerrado, bem como por áreas antropizadas com agricultura e pastagens. Esse experimento foi realizado de Setembro à Novembro de 2014.

3.2.2 Animais

Este estudo foi submetido e aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste – Protocolo 21192 nº 000264/2013-56). Foram utilizadas nove bezerras Nelore (*Bos taurus indicus*) com 4 a 7 meses de idade, pesando 142.58 ± 18.22 Kg e com escore de condição corporal ao redor de 3 (escala de 0 a 5; MACHADO *et. al.* 2008; Figura 3.1). Os animais tiveram alimentação baseada em aleitamento materno, além da disponibilidade de silagem de milho, acesso à pastagem (*Brachiaria decumbens*) e água *ad libitum*.



Figura 3.1 - Bezerros Nelore de 4 a 7 meses de idade utilizadas no experimento de aspiração folicular por laparoscopia.

3.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (Grupo Controle e Tratado) em delineamento *cross-over*, com intervalo de 25 dias entre as réplicas, a partir da última OPU. Foram realizadas um total de 18 OPUs, sendo 9 destas a partir de animais do grupo controle e as outras 9 do grupo tratado. Os animais foram distribuídos dentro dos grupos de forma a evitar o efeito do fator idade, ou seja, animais de todas as idades do intervalo utilizado no experimento foram representados em cada grupo.

3.2.4 Grupo controle (GC)

As bezerras ($n=9$) foram acompanhadas por ultrassonografia transretal diariamente (*MyLab 30 VetGold, Esaote®*) durante 8 dias, a partir do D0. Foi realizada então, a ablação dos maiores folículos pela laparoscopia (aparelho *StorzR, Xenon 300W*) em D2, ou seja, cinco dias antes da OPU.

3.2.5 Grupo tratado (GT)

As bezerras ($n=9$) foram acompanhadas por ultrassonografia transretal diariamente (*MyLab 30 VetGold, Esaote®*) a partir do D0, ou seja, o primeiro dia do protocolo hormonal (Figura 3.2), quando foi inserido dispositivo intravaginal (0,33g de Progesterona. *Eazi-Breed CIDR, Pfizer Saúde Animal, Brasil*) e uma injeção intramuscular (I.M.) de 2mg de Benzoato de Estradiol (B.E.; Ric-BE, *Tecnopec, Brasil*). A partir de D4 foram administradas durante 3 dias (até D6), 6 injeções I.M. de FSH, distribuídas a cada 12 horas (sendo a primeira dose de 40mg acompanhada de mais 5 doses sucessivas de 20mg; perfazendo um total de 140mg; *Folltropin, Bioniche Animal Health, Canadá*). Consecutivamente à última dose de FSH foi administrado 2,5mg I.M. de LH (*Lutropin, Bioniche Animal Health, Canadá*). A OPU foi então realizada após

20-24 horas (D7) da última injeção de FSH. Os dispositivos foram removidos logo após a aspiração.

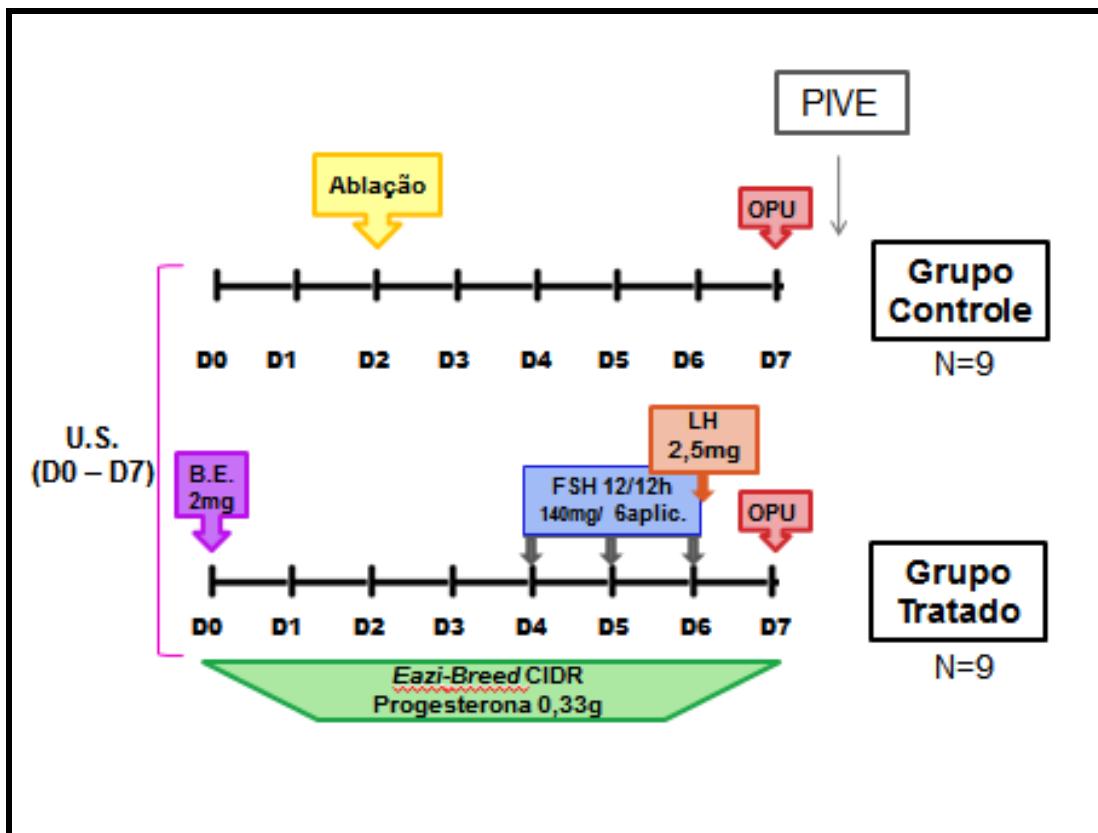


Figura 3.2 – Representação esquemática do protocolo hormonal utilizado em bezerras de 4 a 7 meses de idade.

3.2.6 Protocolo hormonal das receptoras de embrião

Foram selecionadas 18 fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*), adultas, diagnosticadas previamente como vazias, e sem problemas reprodutivos. Esses animais foram submetidos então a um protocolo hormonal de sincronização para Transferência de Embriões. O início deste protocolo (D_{0R}) se deu três dias antes do protocolo utilizado nas bezerras do grupo tratamento (GT), ou seja, 17 dias antes da transferência de embriões (D_{17R}). No D_{0R} foi inserido um dispositivo intravaginal (0,75g de Progesterona Micronizada Prociclar, *Hertape Calier Saúde Animal, S.A., Brasil*) e aplicado 2mg (I.M.) de Benzoato de Estradiol (Ric-BE, *Tecnopec, Brasil*) e em D_{5R} foi administrado

0,150mg de Prostaglandina (D cloprostenol, Veteglan Luteolítico, *Hertape Calier* Saúde Animal, S.A., Brasil). Em D8_R o dispositivo intravaginal foi removido, e em D9_R foi administrado 1mg de Benzoato de Estradiol. Após esse procedimento, os embriões foram transferidos em D17_R, coincidindo com o D7 dos embriões produzidos na PIVE. Antes de cada transferência, os ovários das receptoras foram examinados por ultrassonografia com o objetivo de detectar a presença e a qualidade dos corpos lúteos.

3.2.7 Jejum pré-procedimentos

As bezerras foram preparadas para os procedimentos de laparoscopia a partir de prévio jejum hídrico e alimentar de 24h.

3.2.8 Protocolo anestésico e procedimento laparoscópico

Os animais foram submetidos a protocolo anestésico com a administração (I.M.) de Cloridrato de Xilazina a 2% (Anasedan, Ceva, Brasil) e Sulfato de Atropina a 1% (Sulfato de Atropina, UCB, Brasil). Após 15 minutos, foi administrado Cloridrato de Cetamina a 10% (E.V.; Dopalen, Ceva, Brasil).

As bezerras foram então posicionadas em cama cirúrgica inclinada com suas cabeças voltadas para baixo, em ângulo de 45º, na posição de *Trendelenburg* (FERANTI *et al.* 2010; BARROS *et al.* 2014). Foi realizada então tricotomia e antisepsia da região do abdômen a ser abordada com álcool 70% e Iodo. No local de inserção dos trocartes foi administrado 5,0mL de Cloridrato de Lidocaína a 2,0% (Anestésico Bravet, Bravet, Brasil). A cavidade abdominal foi então distendida com ar atmosférico por meio de bomba de compressão (*Nebular Plus Darú*. Brasil).

Com o auxílio de um bisturi e dos trocartes foram realizadas três incisões na região abdominal, sendo primeiramente introduzido o cateter com o insuflador conectado à válvula de ar, que serviu de acesso para o laparoscópio e, posteriormente, foram introduzidos os demais cateteres utilizados para passagem da pinça anatômica e do sistema de aspiração (Figura 3.3). O sistema de aspiração foi constituído por sistema de mangueira, bomba de vácuo (ajustada a uma pressão negativa de 59mmHg; *Cook VMAR5100*.

Austrália) acoplada a uma agulha descartável sem canhão (40x1,20 18G1 ½ *Injex*). Os ovários foram então localizados e fixados com o auxílio do laparoscópio da pinça anatômica, quando os folículos foram visualizados e aspirados, a partir do sistema de aspiração. Para cada procedimento de aspiração, em cada animal, foi utilizado um novo sistema com mangueira e agulha esterilizada. O conteúdo folicular aspirado foi colhido em tubo cônicoo, contendo o líquido de aspiração. Esse líquido era composto por solução salina fosfatada e tamponada de Dulbecco (DPBS, *Vitrocell* Comércio de Produtos para Laboratório, LTDA, Brasil), com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*), 500µl de gentamicina (*Sigma*) e 32mg de heparina (*Sigma*) em 50ml de DPBS, à temperatura aproximada de 39ºC. Os tubos eram conduzidos imediatamente ao laboratório (contíguo ao curral de coleta) onde seu conteúdo era filtrado em malha 75µm para posterior classificação dos COCs em estéreo-microscópio (*ZeissR Stemi SV6*. Alemanha).

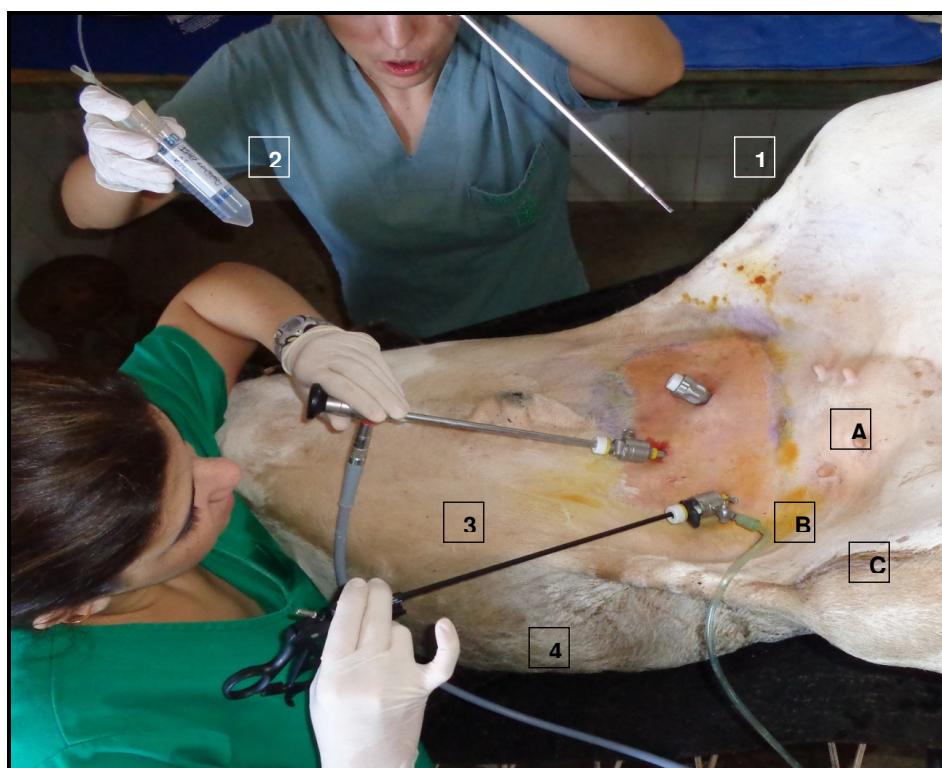


Figura 3.3 – Procedimento de aspiração folicular por laparoscopia em bezerras. A – Trocarte para inserção do Sistema de Aspiração; B – Trocarte para inserção do Laparoscópio; C – Trocarte para inserção da Pinça Anatômica; 1 – Sistema de Aspiração (agulha conectada à mangueira de aspiração, guiada

pela cânula de metal); 2 – Tubo Cônico para coleta do conteúdo folicular; 3 – Laparoscópio; 4 – Pinça Anatômica.

Após cada procedimento, os orifícios das incisões de parede abdominal dos animais foram tratados com antibiótico aerossol (Terra-Cortril Spray, *Pfizer*, Brasil), pomada cicatrizante (Unguento, *Vallée*, Brasil) e repelente a base de Vapona e Supona (Matabicheiras, *Fort Dodge*, Brasil). Além disso, os animais receberam antibioticoterapia injetável, durante três dias.

3.2.9 Ultrassonografia

Os animais (GC e GT) foram submetidos a uma avaliação ultrassonográfica diária (Figura 3.4), a partir do dia 0 (D0) até o dia da aspiração folicular (D7). Os ovários foram então analisados e mensurados (Diâmetro ovariano). Em seguida, foram mensurados e contados os folículos visíveis (População folicular total), os folículos $\geq 2,5\text{mm}$ (População de folículos $\geq 2,5\text{mm}$), e os maiores folículos (Diâmetro máximo dos folículos).



Figura 3.4 – Procedimento de ultrassonografia em bezerras.

3.2.10 PIVE

A classificação ovocitária foi realizada segundo o descrito por Caixeta & Dode (2009; Figura 3.5). Os ovócitos de graus I a IV foram levados à maturação e os ovócitos degenerados e expandidos foram considerados não

viáveis. A aspiração dos ovários de abatedouro foi realizada através de seringas de 20mL acopladas à agulhas (40x1,20 18G1 ½ *Injex*), onde eram aspirados somente folículos com diâmetro entre 3 a 8mm. Os ovócitos foram selecionados e colocados em meio de cultivo (MIV) e posteriormente foi realizada a fecundação *in vitro*.

Para a fecundação dos ovócitos foi utilizado sêmen de um touro Nelore, após avaliação e indicação de qualidade, no já referido laboratório. Para o controle de qualidade do sistema de PIVE do laboratório foram utilizados ovócitos selecionados de ovários obtidos em abatedouro local (Grupo Abatedouro).

Os embriões foram então levados ao cultivo, sendo realizada a avaliação dos embriões (clivagem, clivagem com >4 células, estágio dos embriões em D6 e D7). Os embriões produzidos foram envazados individualmente em meio de cultivo e transferidos para receptoras previamente sincronizadas com protocolo específico para este fim (descrito anteriormente). Estes procedimentos foram realizados segundo a rotina do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, descritos por Carvalho (2009).



Figura 3.5 – Rastreamento e classificação dos ovócitos aspirados de bezerras.

3.2.11 Análise estatística

Os resultados obtidos pelo procedimento de ultrassonografia e pela aspiração folicular foram comparados entre os Grupos Controle e Tratamento e entre os dias (D0 e D7). Para se verificar se houve interação dos dias avaliados (D0 ou D7) com os tratamentos (Controle ou Tratado), foi realizado o teste de análise de variância fatorial 2x2. Como não foi observada essa interação, realizou-se então a análise estatística de acordo com a sua distribuição normal ou não, utilizando os testes t e Man-Whitney, respectivamente.

Os dados relativos à PIVE foram comparados entre os grupos (GC, GT e GA) utilizando-se o teste Qui-Quadrado e Kruskal Wallis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa PROPHET (Versão 5.0; *BBN Systems and Technologies*, 1997), considerando diferença significativa valores de $p<0,05$.

3.3 RESULTADOS

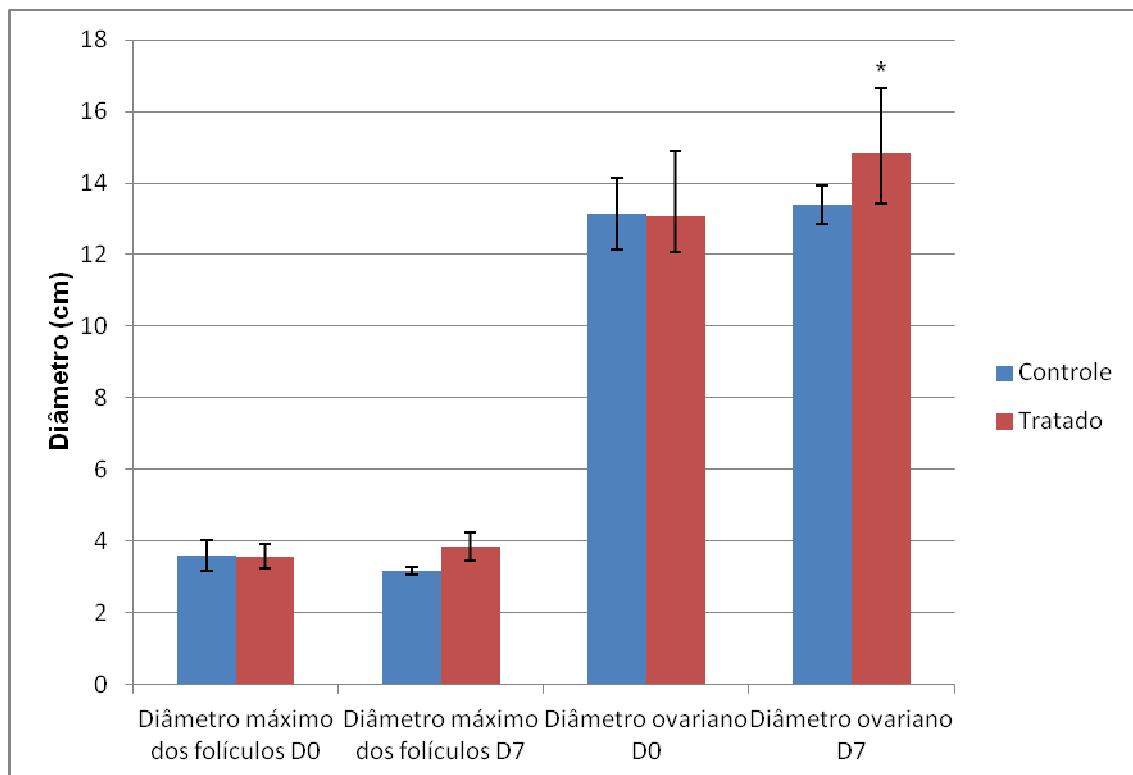
3.3.1 Avaliação ultrassonográfica das características ovarianas

Nas bezerras que sofreram ablação folicular (GC, n=9) não se verificou alteração na população folicular total entre o início (Dia zero - D0) e o final (Dia 7 - D7) do período de avaliação ($18,11 \pm 4,51$; em D0, *versus* - vs $20,77 \pm 4,84$ folículos; em D7; $p=0,2443$; Figura 3.6), observando-se porém, uma maior quantidade ($p=0,0244$) de folículos $\geq 2,5$ mm em D7 ($6,88 \pm 2,14$) do que em D0 ($4,77 \pm 2,33$). Neste grupo, também não ocorreram variações no diâmetro máximo dos folículos ($3,42 \pm 0,4$ mm vs $3,16 \pm 0,27$ mm; $p=0,1294$), bem como no diâmetro ovariano ($13,13 \pm 1,0$ mm vs $13,40 \pm 0,53$ mm; $p=0,4828$), entre D0 e D7, respectivamente.

Diferentemente dos animais controle, as bezerras que foram submetidas ao protocolo hormonal (GT), mostraram um aumento tanto da população folicular total ($20,0 \pm 4,95$ vs $26,66 \pm 4,24$; $p=0,0106$; Figura 3.6), quanto do número de folículos $\geq 2,5$ mm ($4,11 \pm 1,96$ vs $11,55 \pm 4,09$; $p=0,0002$; Figura 3.6), respectivamente para D0 e D7. E, embora não tenha ocorrido neste grupo, entre D0 e D7, um aumento do diâmetro máximo dos folículos ($3,2 \pm$

0,47 mm vs $3,39 \pm 0,51$ mm; respectivamente, $p=0,4122$), o diâmetro ovariano destes animais foi maior ($p=0,0081$) ao final do tratamento ($13,08 \pm 1,0$ mm, em D0 vs $14,81 \pm 1,38$ mm em D7).

Ao final do período de observação (D7), os animais tratados (GT) apresentaram maior população folicular total ($26,66 \pm 4,24$ vs $20,77 \pm 4,84$ folículos; respectivamente para GT e GC; $p=0,0315$), maior população de folículos $\geq 2,5$ mm ($11,55 \pm 4,09$ vs $6,88 \pm 2,14$; $p=0,0080$) e maior diâmetro ovariano do que as respectivas características apresentadas pelas bezerras controle ($14,81 \pm 1,38$ mm vs $13,40 \pm 0,53$ mm; respectivamente para GT e GC; $p=0,0176$; Figura 3.6).



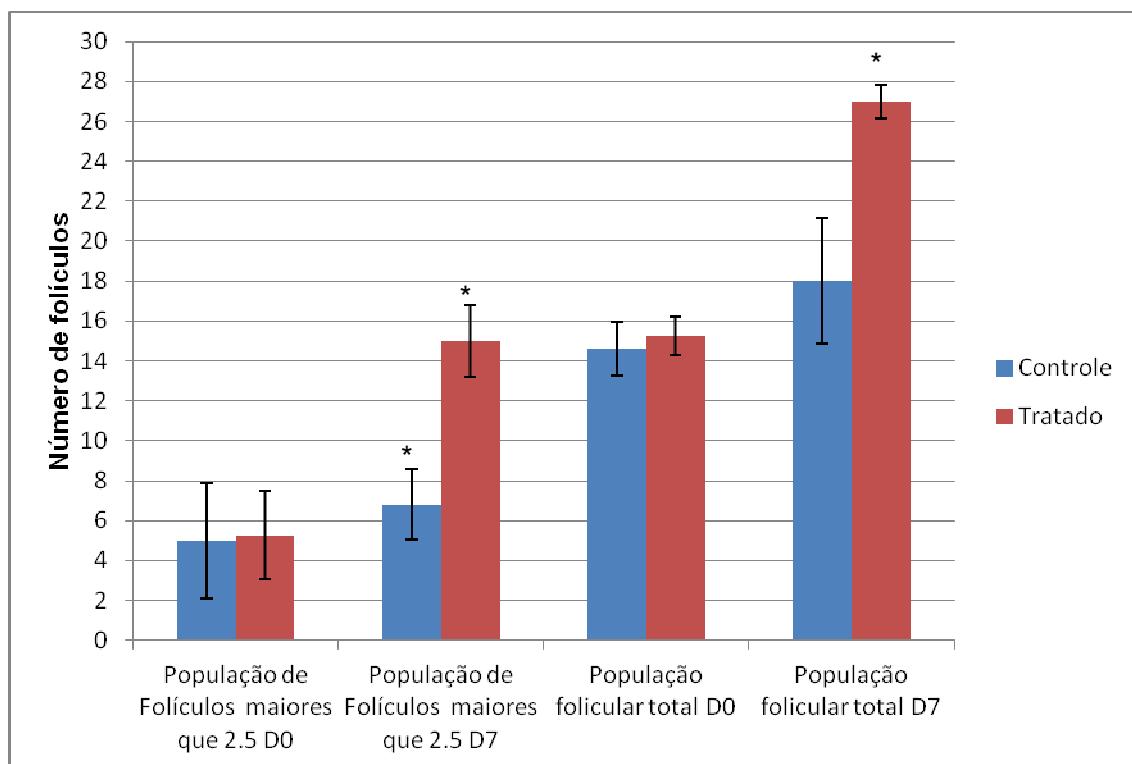


Figura 3.6 - Média \pm DP das características ovarianas (diâmetro – cm e número de folículos) de bezerras do Grupo Controle (que sofreram ablação folicular) e do Grupo Tratado (submetidas a um protocolo hormonal com Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH). Colunas com números diferentes, classificadas em letras iguais, diferem significativamente ($p<0,05$).

3.3.2 Aspiração folicular (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE)

O tratamento hormonal aumentou a quantidade de folículos aspirados (95 vs 152, respectivamente para GC e GT; $p=0,0256$), não se verificando alterações porém, na taxa de recuperação (81,84% vs 69,82%, respectivamente para GC e GT, $p=0,1164$), na quantidade de ovócitos recuperados (75 vs 105; respectivamente para GC e GT; $p=0,1108$; Figura 3.7 e Figura 3.8), e nem tampouco na proporção de ovócitos viáveis e não viáveis (65 e 10 no GC vs 98 e 7 no GT; respectivamente; $p=0,1316$; Figura 3.8).

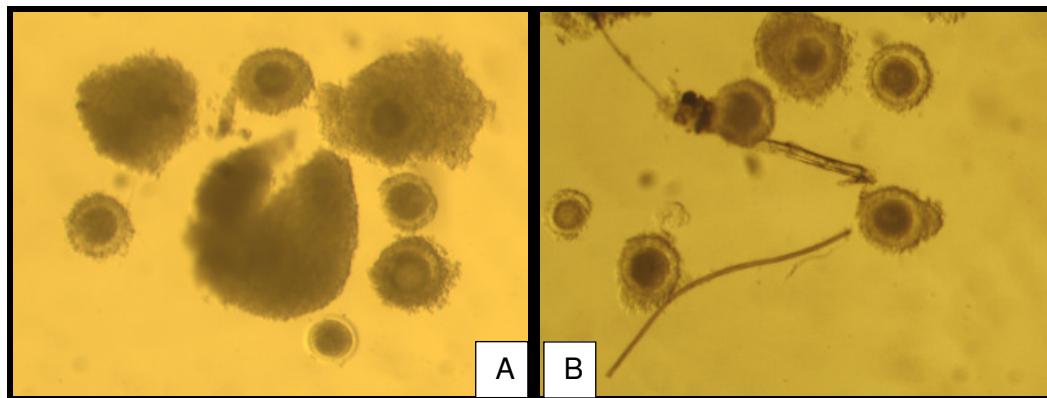


Figura 3.7 – Ovócitos aspirados de bezerras pré-púberes de 4 a 7 meses de idade, do Grupo Tratado (A, protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e Grupo Controle (B, ablação folicular).

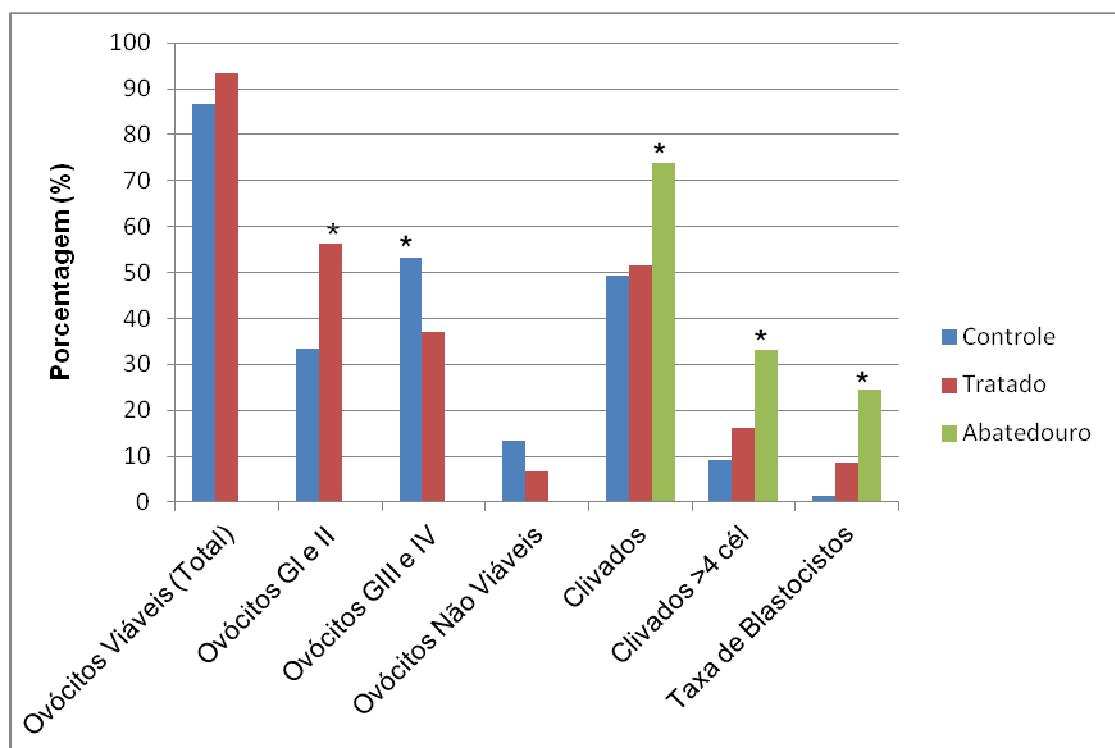


Figura 3.8 - Ovócitos recuperados a partir de bezerras do Grupo Controle (ablação folicular), e do Grupo Tratado (protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH). *Valores diferem significativamente, considerando $p<0,05$.

No entanto, ao se distinguir as categorias (avaliações morfológicas mais detalhadas) destes ovócitos viáveis, observou-se que os animais tratados tiveram predominância de ovócitos graus I e II, enquanto que os do Grupo

Controle tiveram um maior número de ovócitos graus III e IV ($p=0,0065$). Considerando os ovócitos recuperados (de ambos os grupos – GC e GT), um total de 13,8% destes estavam desnudos ou com poucas células do *cumulus* (GIV). Não se verificou diferença entre os grupos GC e GT em relação ao número de clivados (37 vs 54, respectivamente para GC e GT; $p=0,781$; Figura 3.9), ao número de clivados >4 células (7 vs 17, respectivamente para GC e GT; $p=0,178$; Figura 3.9) e ao número de embriões/animal (0,33 vs 1,0, respectivamente para GC e GT; $p=0,236$).

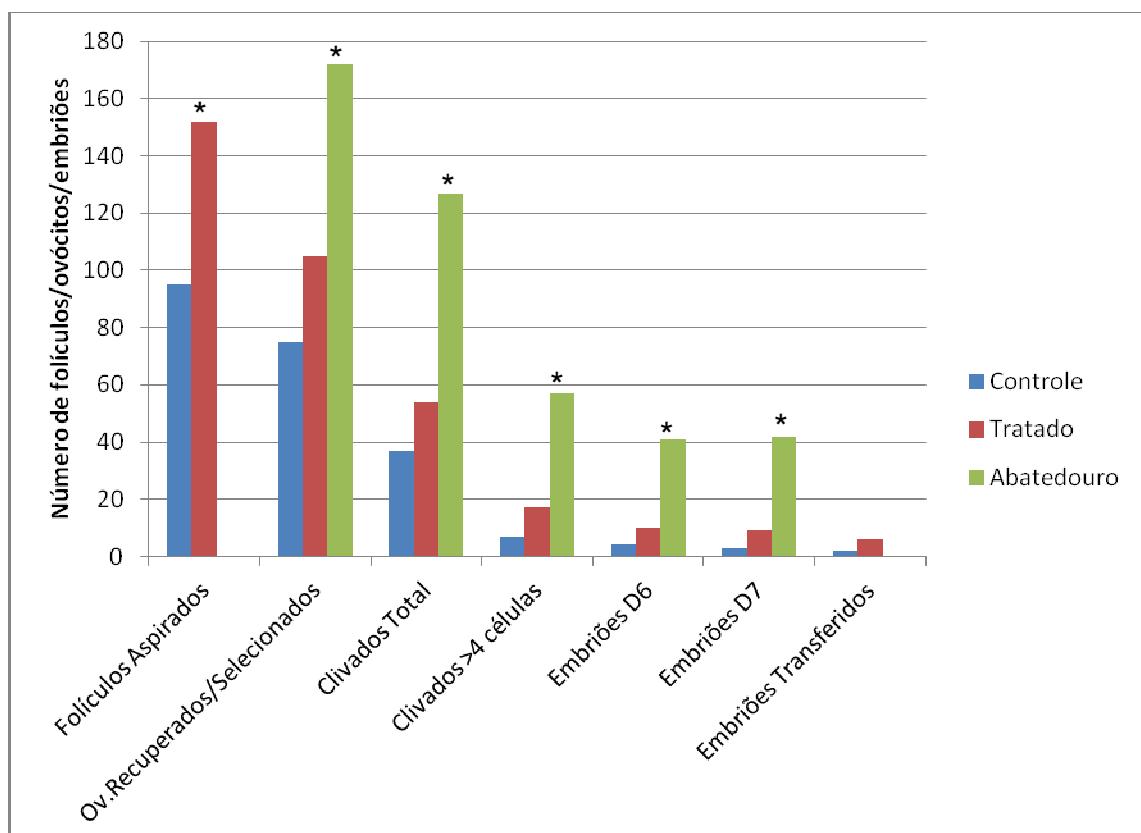


Figura 3.9 - Produção *in vitro* de embriões a partir de ovócitos de bezerras do Grupo Controle (GC, ablação folicular), Grupo Tratado (GT, protocolo hormonal utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e do Grupo Abatedouro (GA, ovários de animais adultos abatidos).

Observou-se semelhança nas taxas de Clivagem Total, Clivagem com mais de 4 células e de Blastocistos entre os grupos Controle e Tratado (Clivagem: 49,33% vs 51,42%, $p=0,7814$; Clivagem com mais de 4 células:

9,33% vs 16,19%, $p=0,1788$ e Blastocisto: 1,33% vs 8,57%, $p=0,2361$; respectivamente para GC e GT; Figura 3.9). O GA, porém, apresentou valores superiores ($p<0,05$) nesses três aspectos (Clivagem: 73,83%; Clivagem com mais de 4 células: 33,13% e Blastocisto: 24,41%).

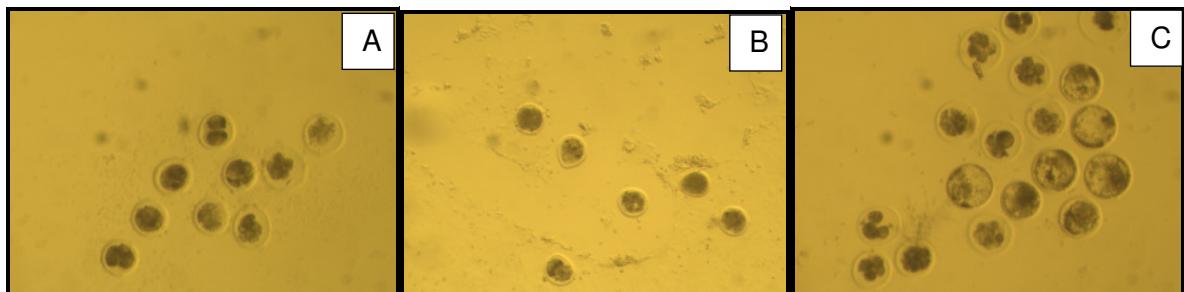


Figura 3.10 - Embriões em D7 do Grupo Controle (A, ablação folicular), Grupo Tratado (B, protocolo utilizando Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) e do Grupo Abatedouro (C, ovários de animais adultos abatidos).

Embora estes experimentos não tenham sido delineados para avaliação de taxas de prenhez, embriões (Fig. 3.10) produzidos a partir de ovócitos das bezerras foram transferidos em D7 (7 dias após fecundação *in vitro*) para sete receptoras adultas, previamente sincronizadas. Sessenta dias após a transferência dos embriões, foi realizado diagnóstico de gestação, por ultrassonografia. Das sete receptoras inovuladas, cinco apresentaram conteúdo líquido no interior do útero, porém encontraram-se vazias.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Protocolo hormonal e características ovarianas

O protocolo hormonal de estimulação ovariana (GT) promoveu um aumento da população folicular total, nas fêmeas pré-púberes estudadas (de $20,0 \pm 4,95$ em D0, para $26,66 \pm 4,24$ em D7; Figura 3.6), o que corroborou com os estudos de Taneja *et al.* (2000; em bezerras de dois a cinco meses de idade) e de Presicce *et al.* (1997; em bezerras de sete e nove meses de idade), que demonstraram que a estimulação com gonadotrofinas em bezerras holandesas também resultou em aumento da população folicular total. Este

tratamento também induziu o aumento do número de folículos $\geq 2,5$ mm (de $4,11 \pm 1,96$ em D0 para $11,55 \pm 4,09$ em D7; Figura 3.6) corroborando com os relatos de Presicce *et al.* (1997) que o tratamento hormonal aumentou o número de folículos antrais grandes (>5 mm) em bezerras *Bos taurus taurus*, de 5 e 7 meses de idade. Esse aumento não foi observado no estudo de Snel-Oliveira *et al.* (2003), onde o número de folículos ≥ 3 mm em bezerras Nelore, de 10 a 12 meses de idade, tratadas com FSH e com FSH+eCG permaneceu semelhante comparados ao grupo sem estimulação hormonal. O resultado encontrado por Snel-Oliveira *et al.* (2003), pode ser explicado pela quantidade de aplicações de FSH realizadas naquele estudo (quatro) ser diferente da quantidade do presente estudo (seis aplicações). Segundo Hafez & Hafez (2004) o FSH possui meia-vida curta havendo, portanto, a necessidade de uma maior quantidade de aplicações, com intervalo de 12 horas. Em consequência do estímulo destas características relatadas, o diâmetro ovariano também aumentou no GT (de $13,08 \pm 1,0$ mm em D0 para $14,81 \pm 1,38$ mm em D7).

Apesar da contribuição das gonadotrofinas sobre os aspectos relatados, houve um aumento no número de folículos $\geq 2,5$ mm mesmo nos animais do GC (de $4,77 \pm 2,33$ em D0 para $6,88 \pm 2,14$ em D7; Figura 3.6), embora aparentemente de menor amplitude do que o observado no GT (de $4,11 \pm 1,96$ em D0 para $11,55 \pm 4,09$ em D7; Figura 3.6). Este aumento, observado no GC, provavelmente se deva à sincronização das ondas foliculares promovida pela ablação folicular realizada em D2, neste protocolo. Ao se remover os folículos de maior diâmetro (folículos dominantes), a partir da liberação de FSH, novos folículos são recrutados, começando uma nova onda de crescimento folicular. Brogliatti *et al.* (1996) demonstraram que, após ablação folicular em bezerras de 6 meses de idade, uma nova onda foi detectada após $1,6 \pm 0,2$ dias. Assim, em D7 no GC também se verificou mais folículos apresentando um diâmetro maior. Contudo, a quantidade aumentada de folículos neste grupo não foi suficiente para aumentar também o diâmetro ovariano em D7 ($13,40 \pm 0,53$ mm vs $13,13 \pm 1,0$; em D7 e D0 respectivamente), diferente do observado no GT ($14,81 \pm 1,38$ vs $13,08 \pm 0,53$ mm; em D7 e D0 respectivamente; $p=0,0081$).

3.4.2 Protocolo hormonal e aspiração folicular

Já desde o procedimento de laparoscopia observou-se visualmente as diferenças entre os ovários das bezerras do GT e os das bezerras do GC, o que se confirmou a partir do diferente número de folículos aspirados nos grupos (95 vs 152, de GC e GT, respectivamente). Estes resultados corroboram com os de Presicce *et al.* (1997), que aspiraram mais folículos em bezerras holandesas de até 11 meses que receberam gonadotrofinas, comparados às bezerras não estimuladas.

A partir do uso do protocolo hormonal não foi observada ainda alteração no número de ovócitos recuperados (75 vs 105, respectivamente para GC e GT), o que corroborou com os relatos de Snel-Oliveira *et al.* (2003), que analisaram ovócitos recuperados de bezerras Nelore entre 10 e 12 meses, avaliando tratamento com gonadotrofinas. No presente estudo, não foi possível verificar alteração, pelo tratamento, nas médias dos ovócitos recuperados por animal e os valores destas também foram semelhantes aos relatados em bezerras Nelore tratadas, de 10 meses de idade ($11,75 \pm 10,40$ vs $11,66 \pm 5,31$; respectivamente para grupo FSH+ECG e para GT do presente trabalho) e ao grupo controle ($7,5 \pm 5,80$ vs $8,33 \pm 2,23$; respectivamente para grupo controle do estudo de SNEL-OLIVEIRA *et al.*, 2003 e no GC do presente trabalho). No entanto, Presicce *et al.* (1997) observaram efeito positivo do tratamento sobre esta característica em bezerras holandesas de 7 meses (16 ± 2 vs 12 ± 1 , em grupo tratado e controle, respectivamente). Os resultados do presente trabalho, embora não conclusivos, podem sugerir que um estudo com um maior número de animais, talvez possa evidenciar um efeito do tratamento hormonal, sobre a recuperação dos ovócitos.

As porcentagens de ovócitos viáveis recuperados nos grupos deste trabalho (93,3% e 86,6% no GT e GC, respectivamente; Figura 3.8) foram semelhantes às relatadas por Taneja *et al.* (2000) em bezerras holandesas de 2 a 4 meses de idade (96% e 92%, respectivamente para grupo tratado e controle), e às relatadas por Presicce *et al.* (1997) em bezerras tratadas de 5 e de 7 meses de idade (92% e 96%, respectivamente). Neste estudo (Presicce et

al., 1997) bezerras tratadas de 9 e de 11 meses de idade apresentam porcentagens menores de ovócitos viáveis recuperados (51% e 54% respectivamente) comparadas às porcentagens encontradas neste estudo, assim como as bezerras não tratadas, de 5 a 11 meses de idade (de 38% até 65% de ovócitos viáveis). No presente estudo, não foi evidenciado aumento no número total de ovócitos viáveis pelo tratamento (98 vs 65 ovócitos viáveis respectivamente para GT e GC, Figura 3.8). Porém, após avaliação morfológica mais detalhada, pôde-se observar maior quantidade de ovócitos graus I e II no grupo tratado (59 vs 25, em GT e GC respectivamente; Figura 3.8) e maior quantidade de ovócitos de graus III e IV no GC (53,3% vs 37,1%; em GC e GT respectivamente; Figura 3.8), demonstrando alguma contribuição do tratamento hormonal sobre a qualidade ovocitária.

Apenas 13,8% dos ovócitos recuperados nestes experimentos (GT e GC agrupados) apresentaram-se desnudos ou com poucas células do *cumulus* (Grau IV), o que corroborou com o descrito em outros estudos (10%, TANEJA *et al.*, 2000; ou 9,54%, SNEL-OLIVEIRA *et al.*, 2003) e evidenciou que a técnica de aspiração folicular foi bem sucedida. Malard *et al.* (2001), por sua vez, após aspirar bezerras Nelore de dois a três meses por laparotomia, obtiveram 35,6 e 32,16% de ovócitos grau IV (grupos controle e tratado, respectivamente). Quando há uma alta taxa de ovócitos desnudos pode-se constatar falha durante o procedimento de aspiração, que pode ser causada por uma pressão desajustada da bomba à vácuo, ou por uma agulha de menor diâmetro. Esses fatores, quando bem ajustados, são fundamentais para a recuperação de ovócitos de boa qualidade (BOLS *et al.*, 1996).

3.4.3 Protocolo hormonal e PIVE

O protocolo hormonal não melhorou a taxa de clivagem das estruturas avaliadas (51,43% e 49,33%, respectivamente em GT e GC; Figura 3.9). Essas taxas foram próximas às observadas por Kauffold *et al.* (2005) em bezerras com até 2 meses de idade, sem tratamento hormonal (52,4%) e aparentemente maiores do que as encontradas no estudo de Taneja *et al.* (2000) em bezerras

de 2 a 4 meses, 41-42% (com ou sem tratamento), ambas em animais *Bos taurus taurus*. Presicce *et al.* (1997) estudando bezerras holandesas de 5 meses, também observaram que o protocolo hormonal utilizado não alterou a clivagem das estruturas, havendo porém aos 7 meses de idade, uma resposta benéfica (de 30% para 49% nos grupos controle e tratado, respectivamente). Conforme o esperado, por utilizar ovários oriundos de fêmeas pós-púberes, o Grupo abatedouro (GA) apresentou melhor desempenho na clivagem, quando comparado aos demais grupos (73,8% vs 51,43% vs 49,33%, para GA, GT e GC respectivamente; Figura 3.9).

Neste estudo o tratamento hormonal não foi eficiente em viabilizar a PIVE, pois não se evidenciou diferença na taxa de blastocistos em D7 entre os grupos controle e tratado (1,33% vs 8,57%, em GC e GT respectivamente). Taneja *et al.* (2000) relataram taxa de blastocistos semelhante à apresentada no GT do presente estudo, em bezerras holandesas de 2 a 4 meses de idade (10-11%). Apesar desta taxa ter sido baixa, possivelmente devido à longa estiagem antes e durante o período do experimento, esta foi maior do que a taxa (valor próximo de zero) apresentada em estudo de Precisse *et al.* (1997), em bezerras holandesas de 5 meses de idade. Já em bezerras mais velhas (9 meses), no estudo de Precisse *et al.* (1997), as taxas de blastocistos foram maiores, tendo o tratamento hormonal, provocado um efeito benéfico sobre a taxa de blastocistos (31% vs 11%, em bezerras tratadas e controle; respectivamente), valor que chegou a 48%, aos 11 meses de idade.

Também não foi evidenciado efeito do tratamento hormonal sobre a quantidade de embriões por animal (0,33 vs 1,0; para GC e GT respectivamente), com resultados próximos aos encontrados por Kauffold *et al.* (2005; 0,7 embrião por animal). Taneja *et al.* (2000) apresentaram médias de embriões transferíveis superiores, em ambos os grupos ($15,2 \pm 3,8$ vs $3,8 \pm 1,7$ embriões transferíveis de bezerras de dois a três meses, respectivamente em grupos de bezerras com ≥ 20 folículos e com < 20 folículos – contagem feita através de laparoscopia prévia).

No presente estudo, os ovócitos das bezerras avaliadas apresentaram um menor potencial de desenvolvimento comparado aos de animais adultos (taxa de blastocistos: 1,33% vs 8,57% vs 24,41%, respectivamente para GC, GT e GA), o que corroborou com diversos estudos que têm indicado que ovócitos oriundos de fêmeas pré-púberes possuem menor competência, quando comparados aos ovócitos oriundos de animais adultos (26% vs 46%, respectivamente para bezerras de 6 a 8 meses e adultas MAJERUS et al., 2000).

Assim, verificou-se que, a tentativa de mimetização parcial de condições hormonais de uma fêmea pós-púbere (presença de hormônios ou de análogos da Progesterona, Estradiol, FSH e LH em doses e regime de oferta controlado) pelo uso de um protocolo hormonal nas bezerras avaliadas não foi efetivo em promover a competência ovocitária necessária à viabilização da PIVE nestes animais.

Conforme esperado, ao dipor de uma maior quantidade de ovários aspirados, o Grupo Abatedouro (GA), quando comparado ao GT e ao GC, apresentou maior número de clivados ($21,16 \pm 5,11$ vs $6,0 \pm 2,69$ vs $4,11 \pm 1,61$; $p=0,0013$), número de clivados >4 células ($9,5 \pm 5,68$ vs $1,88 \pm 1,53$ vs $0,77 \pm 0,66$; $p=0,0125$; Figura 3.9), e número de blastocistos produzidos ($7 \pm 4,60$ vs $1,0 \pm 0,86$ vs $0,33 \pm 0,70$; $p=0,0063$; Figura 3.8), respectivamente para GA, GT e GC; assim como número total de embriões em D6 (50 vs 10; $p=0,0054$, e 50 vs 4; $p=0,0017$ respectivamente para GA vs GT e GA vs GC; Figura 3.9), e número total de embriões em D7 (42 vs 9; $p=0,0277$; e 42 vs 3; $p=0,0006$, respectivamente para GA vs GT e GA vs GC; Figura 3.9). Mesmo a taxa de blastocistos apresentada pelo GA (24,41%) neste estudo foi inferior se comparada às relatadas em outros trabalhos (30%, em ARMSTRONG et al., 1994; 41%, em PRESICCE et al., 1997; 46%, em MAJERUS et al., 2000; e 35-40%, no próprio Laboratório de Reprodução Animal, da Embrapa Recursos Genéticos e Bioecnologia; onde foi realizado o presente trabalho, comunicação oral; 2015). Esse fato pode ser justificado pelo fator nutrição relacionado ao período do ano, ou seja, ao período de seca que antecedeu e que perdurou

durante o tempo em que o experimento foi conduzido. Neste período, os ovários provindos de abatedouro costumam apresentar pior qualidade devido às condições das pastagens dos rebanhos. Assim, Assim, considerando a duração total do desenvolvimento folicular a partir de folículos pré-antrais até o estágio de folículo dominante (BRITT, 1991), o estresse provocado pelo fator nutrição neste período pode ter afetado a qualidade dos ovócitos avaliados.

3.5 CONCLUSÕES

A técnica de aspiração folicular por laparoscopia em bezerras Nelore de 4 a 7 meses de idade foi eficiente na recuperação dos ovócitos.

O uso do tratamento hormonal (Progesterona, Benzoato de Estradiol, FSH e LH) nestes animais aumentou a população total de folículos, o número de folículos $\geq 2,5\text{mm}$, o número de folículos aspirados e a porcentagem de ovócitos viáveis recuperados graus I e II, mas não se mostrou eficiente em aumentar a taxa de blastocistos e o número de embriões por animal, na PIVE.

3.6 PERSPECTIVAS

Estudos moleculares (ex. epigenéticos) comparativos entre ovócitos obtidos de bezerras e de fêmeas adultas poderão contribuir para um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva destes animais e consequentemente para auxiliar na proposição de novos protocolos *in vivo* e *in vitro*, visando à inclusão destes em manejos reprodutivos mais precoces.

Além disto, a técnica de aspiração folicular em bezerras pode ser utilizada como parte de um modelo de pesquisa para estudos em Biologia do Desenvolvimento, Caracterizações Epigenéticas, Avaliações de Protocolos em TRAs e outros.

3.7 REFERÊNCIAS

ANUALPEC. Anuário de Pecuária Brasileira, 2014, Instituto FNP, São Paulo.

ARMSTRONG, D.T.; HOLM, P.; IRVINE,B. et al. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Theriogenology**, v.38, n.4, p.667-678, 1992.

ARMSTRONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; MCLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.1227-1236, 1994.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, n.3, p.333-339, 1997.

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, Woodville, v. 55, p. 1303-1322, 2001.

BARROS, F.F.P.C; TEIXEIRA, P.P.M; SILVA, A.M.; SILVA, A.S.L.; MEDEIROS, R.M.; COELHO, C.M.M.; BANDARRA, M.B.; MACEDO, M.F.; BEZERRA, M.B.; VICENTE, W.R.R. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total videolaparoscópica em ovelha. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 38, n.38, n.2, p.121-126, abr./jun. 2014.

BATISTA, E.O.S.; MACEDO,G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SÁ FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma Antimullerian Hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, 2014.

BALDRIGUI, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Anti-mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murrah heifers compared to holstein and gyr kept under the same management. **Reproduction in Domestic Animals**, 2014.

BO, G.A.; MEDINA, M.; TEGLI, J.C.; COSTAMAGNA, A.; BROGLIATTI, G.M. Fixed-time artificial insemination in CIDRB treated cows induced to ovulate with estradiol benzoate or GnRH. 14th **International Congress on Animal Reproduction**, Stockholm, Sweden, 2000; 2:45.

BOLS, P.E.J.; VAN-SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.; KUIUF, A. Effects aspiration vacum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, USA, v. 45, p.1001-1014,1996.

BRINKS, J. S. Expected progeny differences. Don-Arts Printers, Colorado,1990.

BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves.**Theriogenology**, v.45, n.6, p.1163-76, 1996.

BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GASSER, C.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L. Estradiol benzoate delas new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v. 60, p.647-658,2003.

CAIXETA, E. S.; DODE, M. A. N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Vet. e Zootec.** 17(1): 8-18, 2010.

CAIXETA, E. S., RIPAMONTE, P., FRANCO, M. M. BURATINI JUNIOR, J. DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression. In cumulus cells and oocytes of Bos indicus: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**. East Melbourne, V.21 p. 655-664. 2009.

CARVALHO, J. O. N. Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, **Universidade de Brasília**, 2009, 91p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais).

COLAZO, M.G.; SEFCHECK. M.; ILLUMINATI, H.; MEGLIA G.; SCHMIDT, E.E.; BO, G.A. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology** 1999; 51:404.

EARL, C. R.; FRY, R. C.; MACLELLAN, L. J.; KELLY, J. M.; ARMSTRONG, D. T. In vitro fertilization and developmental potential of prepurbertal calf oocytes. **Gametes: Development Functions**. Ed. Serono Symposia, Rome, 1998

ERICKSON, B.H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **J. Anim. Sci.**, 25:800-805, 1966b.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, Holderness, v. 42, p. 437-442, 1995.

FERANTI, J.P.S.; BRUN, M.V.; ZANELLA, E.; MESSINA, S.A.; GUIZZO JÚNIOR, N.; SANTOS, F.R.; BRAMBATTI, G. Inseminação Intrauterina Laparoscópica por dois diferentes acessos em ovinos. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal – JBCA**, v.3, n.6, suplemento, 2010.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C.R.A.; BAYEUX, B.M.; DIAS, E.A.R.; MONTEIRO, F.M.; ACCORSI, M.; LOPES, R.N.V.R.; BARUSELLI, P.S. Plasma anti-mullerian hormone: na endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donos. **Domestic Animal Endocrinology** 49; 96-104, 2014.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, Fatores de crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed. São Paulo: Manole, p. 33 – 53, 2004.

KAUFFOLD, J.; AMER, H.A.H.; BERGFELD, U.; MÜLLER, F.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. Offspring from Non-stimulated Calves at na Age Younger than Two Months: A Preliminary Report. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n.4, 2005.

LÉVESQUE, J.T.; SIRARD, M.A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.34, p.133-139, 1994.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev.** 1994; 37: 48-53.

LOHUIS, M.M. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.51-60, 1995.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA R. T.; BERGAMASHI, M. A. C. M. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. Circular técnica, Embrapa, 57. São Carlos, dez/ 2008.

MAJERUS, V.; LEQUARRÉ, A.S.; FERGUSON, E.M.; KAIIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Characterization of embryos derived from calf oocytes: Kinetics of Cleavage, Cell Allocation to Inner Cell Mass, and Trophectoderm and Lipid Metabolism, **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p. 346-352, 2000.

MALARD, P.F.; PEIXER, M.A.S.; MARQUES-JUNIOR, A.P.; RUMPF, R. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.6, p.677-682, 2001.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, S.; TACHIKAWA SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, Woodville, v. 48, n. 5, p. 769-774, out. 1997.

PRESICCE, G.A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C.R.; GODKE, R.A.; YANG, X. Age and Hormonal Dependence of Acquisition of Oocyte Competence for Embryogenesis in Prepubertal Calves. **Biology of Reproduction**, v.56, p.386-392, 1997.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNETO, N.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Jornal of Reproduction and Fertility**, Tokyo, v. 103, p. 115-120, 1995.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Rev. Bras. Zootec.**, v.36, suplemento especial, p.229-233, 2007.

SALAMONE, D.F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biol Reprod.** 2001; 64: 1761–8.

SALHA, O.; ABUSHEIKA, N.; SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, p. 816-832, 1998.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; Produção in vivo e in vitro de embriões bovino In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 561-584. I, 2010.

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

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; PEREIRA, D.C.; MALAGONI JUNIOR, D.; RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-púberes da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.1, p.106-114, 2003.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; *et al.* Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes *in vitro* and *in vivo*: Influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.206-213, 2000.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 35. **Anais..**, Salvador: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p. 915-919. 2007.

APÊNDICE

Ovarian follicular dynamics in 2 to 3 months old Nelore calves (*Bos taurus indicus*)

T.A. Zacarias¹, S.B. Sena-Netto², A.S. Mendonça¹, M.M. Franco^{1,3}, R.A. Figueiredo^{3,4}

¹Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil.

²Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil.

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF, Brazil.

Abstract

This study aimed to evaluate reproductive physiology aspects in 2 to 3 month old Nelore (*Bos taurus indicus*) calves. Follicular dynamics was monitored daily by ultrasound in ten calves during 18 consecutive days. Calves younger than 2.25 months old ($n = 4$) had maximum follicle diameters ≤ 2.5 mm, so only the other animals ($n = 6$) continued to be monitored by ultrasound. The mean maximum diameter of the ovaries was 13.6 ± 0.6 mm, which had 31.4 ± 3.45 visible follicles. A successive anovulatory follicular wave-like pattern was identified when each wave showed a dominant follicle, including a variable number of other follicles smaller in size (subordinate follicles), during the observational period. Three consecutive follicular growth waves were detected per animal, during this time interval, when 50% of the animals ($n = 3$) showed two waves and the other half ($n = 3$) had three waves. The first day of detection of the dominant follicle, retrospectively identified at a diameter of 2 mm, was defined as the day of wave emergence on each wave (day zero). Considering the grouped data, the follicular wave length was 9.2 ± 2.0 days and the correlated dominant follicle began its regression at 6.33 ± 1.63 days after the day of its emergence. The dominant follicles had a growth rate of 0.23 ± 0.06 mm/day and reached the maximum diameter of 3.03 ± 0.17 mm. Despite the smaller ovarian and follicle diameters in 2 to 3 month old Nelore calves (*Bos taurus indicus*) compared to studies in post pubertal females; the follicular wave-like pattern and the number of recruited follicles were similar to the reported in Zebu females in reproductive activity. These data can characterize an early critical moment on the reproductive development of these animals.

Keywords: prepubertal female, reproductive physiology, ultrasound.

Introduction

The use of ultrasonography has allowed a better understanding of the bovine ovarian follicular dynamics in a real time and noninvasive manner. This tool can aid the understanding of the physiological, morphological and endocrine changes in the estrous

cycle of these females, including growth, regression of ovarian follicles and ovulation as well as the changes on the corpus luteum (CL; Ginther *et al.*, 1989; Kastelic, 1994; Kulick *et al.*, 1999; Ireland *et al.*, 2000).

The follicular population in the bovine ovary contains two different groups of follicles, one "with no growth" (which contains primordial follicles) and the "growing" one (primary, secondary and tertiary follicles (Kanitz, 2001). The ovaries of a newborn calf can contain over than 100,000 primordial follicles (Erickson, 1966). The wave pattern of follicular growth occurs from the follicular recruitment, which is the entry of follicles in the "growing" group, starting with the activation of the primordial follicle (Oliveira *et al.*, 2011). The development of antral follicles in female cattle occurs in a wave-like pattern of follicular growth, where a follicle (dominant follicle - DF) grows more than the others (subordinate follicles), and may subsequently suffer atresia or ovulate (in post-pubertal females) as seen in European (taurines, *Bos taurus taurus*; Pierson and Ginther, 1988; Driancourt, 2001) and Indian breeds (Zebu cattle, *Bos taurus indicus*; Rhodes *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2000; Sartori and Barros, 2011). Adams *et al.* (1992) reported that there is a FSH surge preceding the recruitment of follicles on each wave in heifers.

Among the mechanisms described to explain the occurrence of dominant and subordinate follicles is that DF changes its dependence on FSH to LH, continuing to grow even during the FSH deprivation in detriment of the other follicles, which stop growing and undergo atresia (subordinates; Ginther *et al.*, 1996). Despite the gonadotropins (FSH and LH) playing a primary endocrine role on follicular development, local factors can also interfere on this process as inhibin and IGF-1 (Insulin Like Growth Factor - 1). Inhibin secretion by the DF, by negative feedback, decreases the FSH secretion, playing an important role on the follicular recruitment and development (Turzillo and Fortune, 1993).

Despite its later puberty (reviewed by Randel, 2005), reports describe a greater follicle recruitment per wave in Zebu cattle than in taurines (33.4 ± 3.3 vs. 25.0 ± 2.5 respectively; Carvalho *et al.*, 2008 and 39.0 ± 4.0 vs. 21.0 ± 4.0 ; Alvarez *et al.*, 2000). Additionally, it is described that the maximum diameter

Corresponding author: ricardo.a.figueiredo@embrapa.br

Phone: +55(61)3448-4961/3500 4442; Fax: +55(61)3340-3624

Received: July 15, 2014

Accepted: January 5, 2015

of dominant follicles in Zebu cattle (10-13 mm; Figueiredo *et al.*, 1997; Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho Ireland *et al.*, 2000), both post-pubertal females.

These follicular wave patterns appear both in post-pubertal (two or three waves until ovulation) and prepubertal (continuous growth of follicles, without ovulation; Adams *et al.*, 2008) females. The reproduction activity constriction by the absence of ovulation in female cattle, sheep and prepubertal female rats is due to this activity inhibition by greater sensitivity to estradiol in the hypothalamus (Ramirez and McCann, 1963; Ramirez and Sawyer, 1965; Day *et al.*, 1987) resulting in negative feedback on this structure.

Silva-Santos *et al.* (2011), evaluating *Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus* histological sections of ovaries from fetuses, heifers and cows, concluded that there is much individual variation in the number of ovarian follicles from Zebu cattle compared to taurines. Analyzing these materials in heifer ovaries, Erickson (1966) reported that right after the birth, only few antral follicles can be viewed macroscopically (7 ± 2), but this number starts to increase from two month old calves (49 ± 10). They also observed that this quantity tends to decrease in eight month old animals (33 ± 9). Adams *et al.* (1994) monitored 9 month old prepubertal *Bos taurus taurus* and found that the follicle growth occurs in a wave pattern. They reported that the calves had two follicular waves in an 18 day interval. Evans *et al.* (1994) studying the follicular dynamics and the secretion of gonadotropins in ten Hereford calves (0.5 to 9 months old *Bos taurus taurus*) observed higher maximum diameter of the dominant and subordinate follicles in 0.5 to 2 month old calves. They also found that there is an increase in serum gonadotropin concentrations in 1 to 3.5 month old calves.

This study aimed to evaluate, by ultrasonography, ovarian follicular dynamics in 2 to 3 month old Nelore calves (*Bos taurus indicus*).

Materials and Methods

Localization

The study was conducted at the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology Experimental Farm, in Brasilia, Federal District (DF), located at $15^{\circ}52'$ to $15^{\circ}56'$ S and $48^{\circ}00'$ to $48^{\circ}02'$ W, altitudes between 1,050 and 1,250, a tropical climate region. Its area is about 1,800 ha occupied by Cerrado biome native vegetation as well as by agriculture and pasture.

Animals

This study was submitted and approved by CEUA (Ethics Committee on Animal Use from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology,

et al., 2007) is smaller than those reported in taurines (16-20 mm; Ginther *et al.*, 1989; Kastelic, 1994; Brasilia, DF). Ten Nelore calves (2 to 3 months old) were kept with their mothers with *water available ad libitum*. Their body weight ranged from 55 to 100 kg and body condition score was around 3 (range 0 to 5).

Ultrasonographic examinations and record data

This experiment was performed from June to July 2014, during the winter season. The ovaries of each calf were monitored by transrectal ultrasonography using a linear transducer 7.5 MHz (Aloka 500. Aloka CO. Ltd. Tokyo, Japan) connected to a rigid plastic adapter composed of polyvinyl chloride (PVC) approximately 40 cm long, which had a proper diameter to fit the probe.

The ultrasonographic evaluations were performed daily by the same operator up to 18 days (as described by Adams *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994). The images of ovaries were identified, frozen when necessary and the diameters on each animal were measured by the mean between the maximum longitudinal and the perpendicular diameters. The overall mean of the maximum diameter of the ovaries was obtained by the sum of the maximum diameter of the ovaries on each animal divided by the total number of animals.

The follicles were then identified, counted and measured in the same manner as described for the ovaries. Data were recorded on diagrams, aiming to register number, size, relative position of the follicles in the ovaries, image quality, the time of examination, animal identification, among others. Only follicle diameters ≥ 2 mm were measured and recorded. All follicles (≥ 2 mm in diameter) detected in both ovaries for each day were counted.

The first day of detection of the dominant follicle on each wave, identified at a diameter of 2 mm, was defined as the day of this wave emergence. The follicular waves were monitored since the DF diameter reached ≥ 2 mm (detection day) until its regression to the initial size and so on for the successive waves. The Wave lengths were obtained by subtracting its detection day from the last day when the DF was detected (≥ 2 mm) on each wave. The Onset of atresia of each wave was considered the day immediately before the day when the DF diameter was smaller than its previous measurement, counted from the day of detection of each wave. The follicular waves were designated as the first, second and third waves detected during the observational period (as described by Adams *et al.*, 1994). The inter-wave interval was defined as the number of days between the emergences of successive dominant follicles. The DF growth rate of each wave was obtained by subtracting the minimum DF diameter from the maximum DF diameter (≥ 2 mm), divided by



the number of days of the growth period.

During the daily ultrasound in animals ($n = 10$) it was found that some ($n = 4$, age ≤ 2.25 months) only had follicles ≤ 2.5 mm. Thus, the other animals ($n = 6$) had their follicular waves monitored.

Data analysis

For each wave a descriptive analysis (Mean \pm Standard Deviation - SD) was performed for the following characteristics: Maximum diameter of the DF (mm), Onset of atresia of the DF (day), Growth rate of the DF (mm/day), Wave length (days) and Inter-wave interval (IWI, days). The Mean \pm SD was also obtained for Maximum diameter of the ovaries and Number of follicles detected, completing the descriptive analysis.

The Mann-Whitney test (PROPHET Version 5.0 Program; BBN Systems and Technologies, 1997) was used to compare calves ($n = 3$) which showed 3 waves for calves which showed two waves during the same observational period.

Results

The 1 to 2.25 month old calves ($n = 4$) had maximum follicle diameters of ≤ 2.5 mm and, consequently, were not used in the records of follicular

waves.

A pattern of successive anovulatory follicular waves was observed, including a dominant follicle (DF) and a variable number of other smaller follicles (subordinates) per wave. During 18 consecutive days, 50% of the animals ($n = 3$) had two waves and the other half had three waves of follicular growth.

The maximum diameter of the ovaries was 13.6 ± 0.6 mm containing 31.4 ± 3.45 visible follicles on ultrasound (Tab.1). The maximum diameter of dominant follicle was 3.03 ± 0.17 mm ($n = 15$ waves), which had a growth rate of 0.23 ± 0.06 mm/day ($n = 15$ waves) and its onset of atresia on the 6.33 ± 1.63 th day from the detection day of each wave ($n = 15$ waves. Tab.1). Wave length was 9.2 ± 2.0 days ($n = 15$ waves) and the Inter-wave interval (IWI) was 5.55 ± 2.55 ($n = 9$ waves; Tab.1).

Even the calves ($n = 3$) which showed a higher number of waves (3 waves) had similar IWIs compared to animals which showed two waves (4.66 ± 2.08 vs. 7.0 ± 1.0 ; respectively for three vs. two follicular waves animals; $P = 0.795$), during the same observational period.

In order to illustrate the dynamics of the dominant and the largest subordinate follicles during the observational period, graphics of 2.7 ± 0.33 month old calves ($n = 6$) are shown on Fig. 1 to 6.

Table1. Characteristics of ovaries and follicular waves in Zebu calves by ultrasonography.

Ovarian/Follicular characteristics	Value*
Maximum diameter of the ovaries (mm; $n = 12$ ovaries)	13.6 ± 0.6
Number follicles detected ≥ 2 mm ($n = 6$ animals)	31.4 ± 3.45
Maximum diameter of the dominant follicle (mm; $n = 15$ waves)	3.03 ± 0.17
Growth rate of the dominant follicles (mm/day; $n = 15$ waves)	0.23 ± 0.06
Wave length (days; $n = 15$ waves)	9.2 ± 2.0
Onset of atresia of dominant follicle (day; $n = 15$ waves)	6.33 ± 1.63
Inter-wave Interval (IWI; days; $n = 9$ waves)	5.55 ± 2.55

*Mean \pm SD (standard deviation).

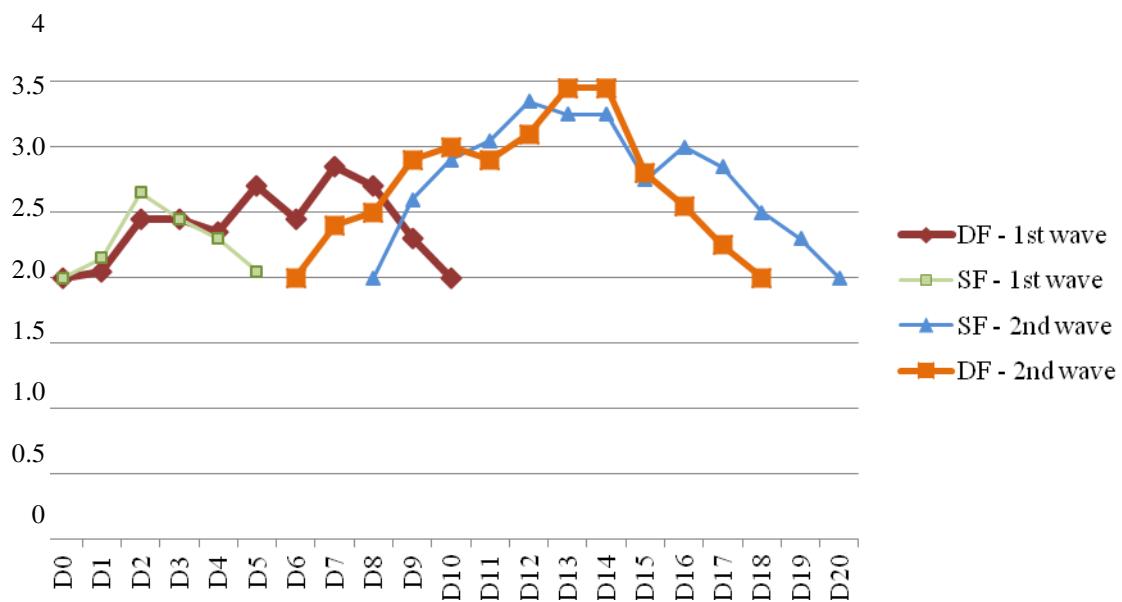


Figure 1. Follicular dynamics in a 3 month old calf.

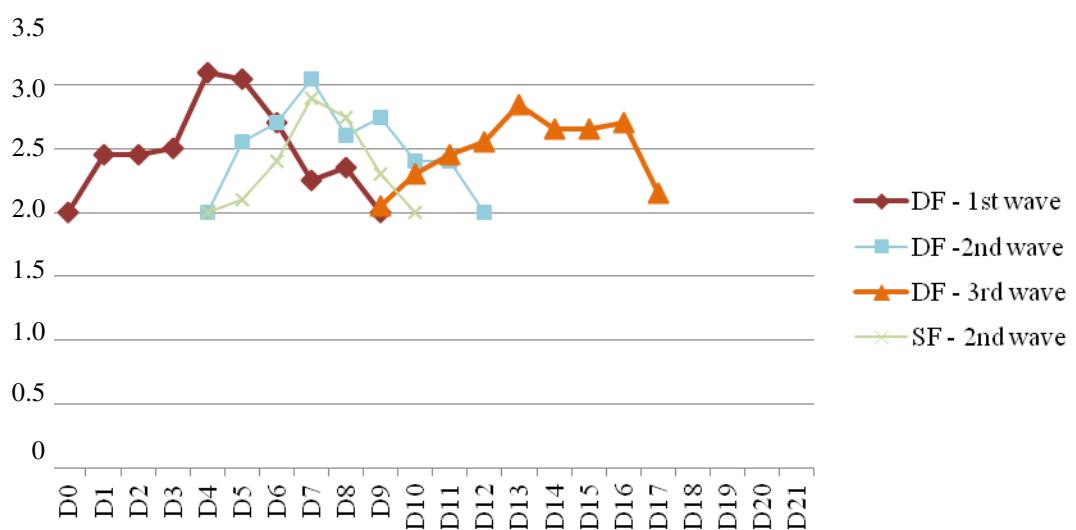


Figure 2. Follicular dynamics in a 3 month old calf.

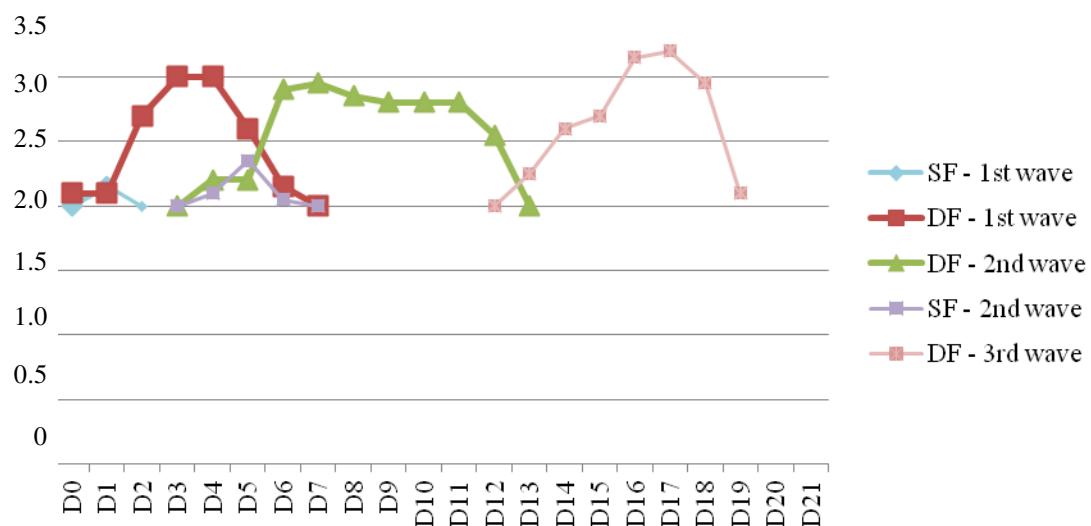


Figure 3. Follicular dynamics in a 3 month old calf.

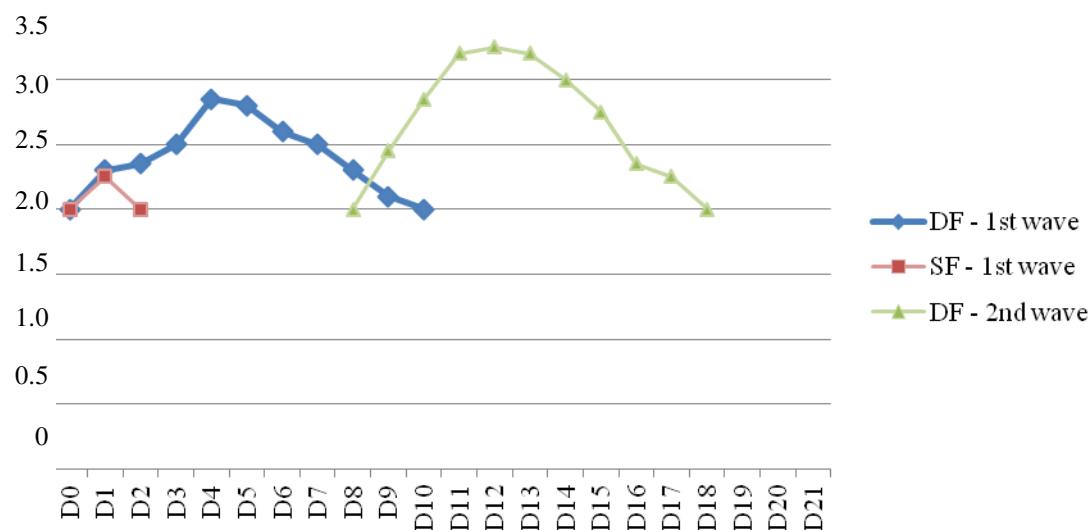


Figure 4. Follicular dynamics in a 2.5 month old calf.

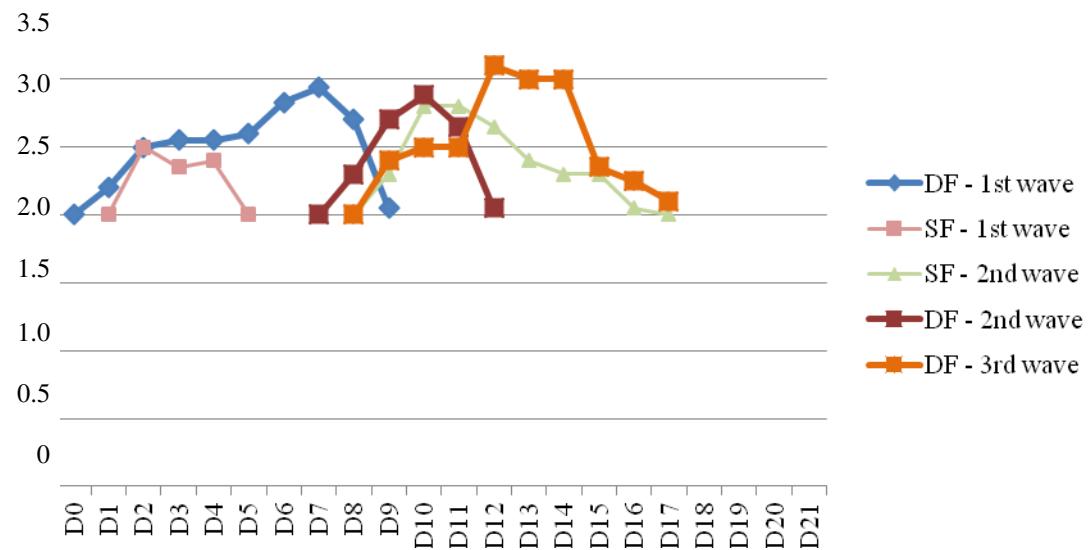


Figure 5. Follicular dynamics in a 2.25 month old calf.

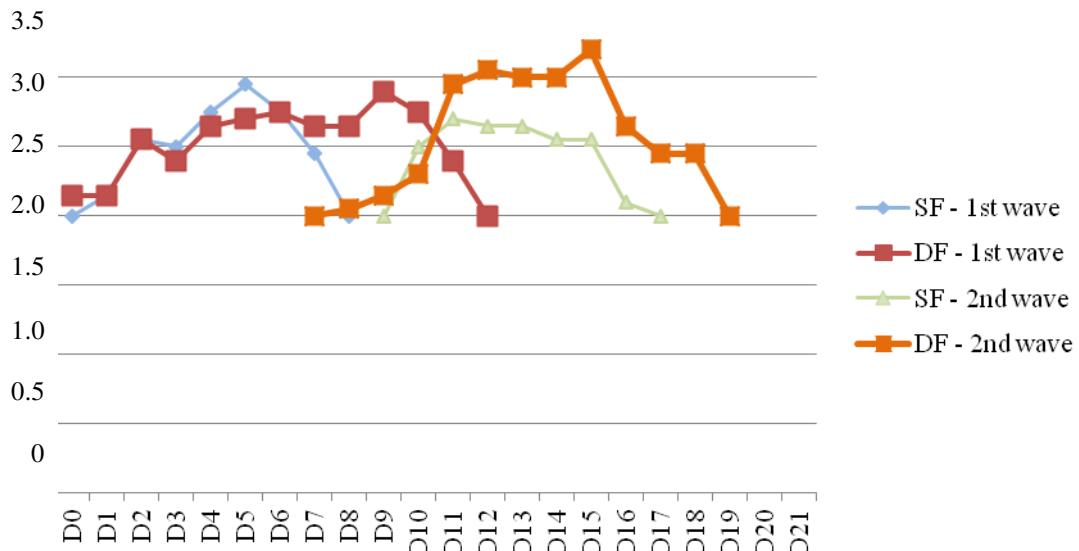


Figure 6. Follicular dynamics in a 2.5 month old calf.

Discussion

The fact that the *Bos taurus indicus* calves younger than 2.25 months old ($n = 4$) in this study did not present follicles larger than 2.5 mm diameter, corroborates a study by Erickson (1966), who demonstrated that calves (*Bos taurus taurus*) began to present a greater number of antral follicles from 2 months old on. However, Kauffold *et al.* (2005) conducting follicular aspiration in *Bos taurus taurus* calves (<2 months old) demonstrated that those animals had follicle diameters >8 mm. The onset of reproductive activity or even the steps before this stage can be influenced by several factors (e.g., climate, nutrition, handling, breed). Additionally, there is a particular distinction between Zebu cattle (*Bos taurus indicus*), which is usually begins reproductive activity later than the taurine (Randel, 2005). Therefore, besides subspecies issues, other factors may influence the follicular population (Ireland *et al.*, 2008, 2011). Variations within the same breed may occur, for example: in bovine of the same breed, there are animals with different follicular populations according to the farm. Despite this variation, it is known that the repeatability in the antral follicle count is maintained in the same individual. So, some of these factors could have determined the moment that the evaluated calves began to show larger follicles.

The successive follicular wave-like pattern observed in 2.7 ± 0.33 month old calves corroborates reported data in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* as in post-pubertal (Pierson and Ginther, 1988, Rhodes *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2000; Sartori and Barros, 2011) and in prepubertal

females follicular dynamics (Evans *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2008). The same was observed for the presence of a dominant follicle and a variable number of subordinate follicles, which could be explained by the presumed secretion of inhibin by DF, which would decrease the serum concentration of FSH (Turzillo and Fortune, 1993) beyond changing dependence of the dominant follicle FSH to LH, which allows it to continue to grow even during the deprivation of FSH in the detriment of other follicles (Ginther *et al.*, 1996).

It was also expected that the observed waves in this study were anovulatory due to specific blockade peaks in the secretion of GnRH in the hypothalamus of prepubertal females, which consequently limits peaks of FSH and LH sufficient to promote the development of follicles to the preovulatory phase and to the resulting ovulation (Ramirez and McCann, 1963; Ramirez and Sawyer, 1965; Day *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 2008). The same reason can also explain the fact that the maximum diameter of the dominant follicles of these calves (3.03 ± 0.17 mm) was smaller than those reported in *Bos taurus indicus* post-pubertal females (10 to 13 mm, Figueiredo *et al.*, 1997; Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2007) and, consequently, the maximum diameter of the ovaries was lower too (13.6 vs. 27.2 mm, on this study vs. Carvalho *et al.*, 2008 reported data; respectively) due to containing smaller follicles, as well as not having any CL.

The number of follicles detected in the calves' ovaries (≥ 2 mm; 31.4 ± 3.45) was similar to that reported in post-pubertal Zebu cattle (33.4 ± 3.3 , Carvalho *et al.*, 2008 and 39.0 ± 4.0 , Alvarez *et al.*, 2000) and was higher than those reported for post-

pubertal taurine females (25.0 ± 2.5 , Carvalho *et al.*, 2008 and 21.0 ± 4.0 , Alvarez *et al.*, 2000) or 3.5 month old prepubertal calves (19.4 ± 2.1 , Evans *et al.*, 1994). This occurrence can be explained by the fact that the evaluated calves were Zebu cattle (*Bos taurus indicus*), thus it can develop a greater number of follicles per wave than taurines.

The growth rate of the dominant follicle was up to 0.23 ± 0.06 mm/day; that is lower than that reported in cows (0.92 mm/day in Nelore breed, Figueiredo *et al.*, 1997, and 1.6 mm/day in taurine, Sirois and Fortune, 1988).

The wave length in the evaluated calves (9.2 ± 2.0 days) was similar to that reported by Evans *et al.* (1994, 11.6 ± 1.3 days) in 2 month old *Bos taurus taurus* calves (Hereford) and that reported by Reis *et al.* (2005), in 22 month old prepubertal Zebu heifers (Gir), who reported that 12% of the animals showed follicular wave of up to 12 days and about 88% of the animals had wave lenght of 13 to 17 days. Similar wave length reported on this study was also described by other authors in Zebu females (Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

The Onset of atresia of the dominant follicles in monitored calves occurred from the 6.33 ± 1.63 th day on, that is similar to that reported in 22 month old prepubertal heifers by Reis *et al.* (2005; 7.4 ± 0.3 days; Gir), Adams *et al.* (1994; around day 8, 8 month old Hereford heifers) and Evans *et al.* (1994; around day 5 in 1 month old Hereford calves) and post-pubertal Nelore females by Figueiredo *et al.* (1997; 8.86 ± 0.5 days).

In conclusion, despite the smaller ovarian and follicle diameters in 2 to 3 month old Nelore calves (*Bos taurus indicus*) compared to studies in post pubertal females; the follicular wave-like pattern and the number of recruited follicles were similar to the reported in Zebu females at reproductive activity. These data can characterize an early critical moment on reproductive development of these animals.

References

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ.** 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*, 94:177-188.
- Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC.** 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J Reprod Fertil*, 100:27-33.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P.** 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69:72-80.
- Alvarez P, Spicer LJ, Chase Jr CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wettemann RP.** 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci*, 78:1291-1302.
- Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS.** 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69:167-175.
- Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP, Brito LF.** 2007. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, 98:189-196.
- Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE.** 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod*, 37:1054-1065.
- Driancourt MA.** 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55:1211-1239.
- Erickson BH.** 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25:800-805.
- Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC.** 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil*, 102:463-470.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP.** 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47:1489-1505.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP.** 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J Reprod Fertil*, v.87, p.223-230.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K.** 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 55:1187-1194.
- Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF.** 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci*, 83:1648-1658.
- Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ.** 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*, 79:1219-1225.
- Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC.** 2011. 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. *Reprod Fertil Dev*, 23:1-14.
- Kanitz W.** 2001. Comparative aspects of follicular

development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Arch Anim Breed*, 44:p.9-23.

Kastelic JP. 1994. Understanding ovarian follicular development in cattle. *Vet Med*, 6:64-71.

Kauffold J, Amer HAH, Bergfeld U, Muller F, Weber W, Sobiraj A. 2005. Offspring from non-stimulated calves at an age younger than two months: a preliminary report. *J Reprod Dev*, v.51:427-432.

Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, 52:913-921.

Oliveira MEF, Ferreira RM, Mingoti GZ. 2011. Controle do crescimento e da seleção follicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Rev Bras Reprod Anim*, 35:418-432.

Pierson RA, Ginther OJ. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29:21-37.

Ramirez VD, Mccann SM. 1963. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult. *Endocrinology*, 72:452-464.

Ramirez VD, Sawyer CH. 1965. Advancement of puberty in the female rat by estrogen. *Endocrinology*, 76:1158-1168.

Randel RD. 2005. Reproduction of *Bos indicus* breeds and crosses. In: Proceedings. Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, 2005, College Station, TX. College Station, TX: Texas A&M University. 20 pp.

Reis AR, Reyes A, Gambarini ML, Rumpf R, Oliveira CC, Oliveira Filho BD. 2005. Dinâmica follicular por ultrassonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. *Arch Latinoam Prod Anim*, 13:51-55.

Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, De'Ath G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. *J Reprod Fertil*, 104:41-49.

Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, 63:2382-2394

Sartori R, Barros CM. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 124:244-250.

Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturio L, Melo-Sterza FA, Seneda MM. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76:1051-1057.

Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*, 39:308-317.

Turzillo AM, Fortune JE. 1993. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J Reprod Fertil*, 98:113-119.

Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq Agrop Bras*, 35:2501-2509.

