



---

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**FÁBIO LUCAS ZITO DE MORAES**

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA  
TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO  
FIXO**

---

Arapongas  
2016

**FÁBIO LUCAS ZITO DE MORAES**

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA  
TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO  
FIXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito final à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Arapongas  
2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU  
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,  
DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação  
Universidade Norte do Paraná  
Biblioteca Central  
Setor de Tratamento da Informação**

M82i Moraes, Fábio Lucas Zito de  
Influência da contagem de folículos antrais na taxa de  
concepção de vacas inseminadas em tempo fixo./ Fábio Lucas  
Zito de Moraes. Arapongas: [s.n], 2016  
48f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de  
Ruminantes). Universidade Norte do Paraná; Universidade  
Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

1 – Medicina Veterinária -dissertação de mestrado-  
UNOPAR/UDEL 2- Eficiência reprodutiva 3- Prenhez 4-  
IATF 5-Oócitos 6- Inseminação artificial I- Seneda, Marcelo  
Marcondes orient. II- Universidade Norte do Paraná, III –  
Universidade Estadual de Londrina.

CDU 636.2.034

FÁBIO LUCAS ZITO DE MORAES

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA  
TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO  
FIXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito final à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Flávio Guiselli Lopes  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Garbelini Gomes Zanin  
Centro Universitário Filadélfia

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

Dedico este trabalho aos meus pais, Neli e José Lucas, pela educação, pelo exemplo de batalha e dedicação, proporcionado durante toda minha vida.

Aos meus irmãos, Gustavo e Sandra.

À minha esposa, Silvia, e minhas filhas Lívia e Clara.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, causa maior da nossa existência, que com sua luz e proteção está presente em todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao Professor Marcelo, por ter me recebido e acreditado em mim. Pelas seguidas palavras de otimismo, ensinamentos, confiança e consideração que teve por mim durante todo período do Mestrado. Muito Obrigado!

Agradeço aos membros da banca de qualificação (Prof. Dr. Celso Koetz Junior, e Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos) pelas importantes contribuições para este trabalho.

Agradeço aos membros da banca de defesa (Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin, Prof. Dr. Flávio Guiselli Lopes) por participarem deste importante momento em minha carreira e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

Agradeço aos colegas Paula Lunardelli e Fábio Morotti que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. À Camila Costa, Camila Rosa e Camila Bizarro pela pronta ajuda prestada por elas. E agradeço a os amigos da equipe do REPROA: Camila Rosa, Ferzinha, Andressa, Isabela, Fabiana, Fábio, Larissa, Camila Costa, Marilu, Luciana, Anne, João Vitor, Gustavo, Eleni, Lhays, Emanuel, Paulinha, Camila Bizarro e Suellen.

Agradeço a todos os colegas da turma 15 do Mestrado da UNOPAR, pela amizade e companheirismo. Ao prof. Dr. Werner Okano, coordenador do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção de Ruminantes, e à Natália, secretária da pós-graduação.

Não poderia deixar de agradecer aos funcionários da fazenda: Kutu, Beto, Kelé, Lobisomen e Seu Bené.

**MUITO OBRIGADO!**

“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível, de repente você estará fazendo o impossível”.

**São Francisco de Assis**

MORAES, Fábio Lucas Zito. **Influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo**. 2016. 48 p. Dissertação Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, 2016.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da contagem de folículos antrais (CFA) sobre as taxas de concepção em vacas submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 736 fêmeas *Bos indicus*, com escore de condição corporal (ECC) variando de 2,5 a 3,5 (escala 1-5). Os animais foram destinados à IATF e submetidos a um protocolo padrão de sincronização da ovulação em um dia aleatório do ciclo estral denominado D0, com a inserção de dispositivo intravaginal contendo 0,588 g de P4 em associação à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol pela via intramuscular (IM). Após 8 dias (D8), houve remoção da P4, administração de 150 µg de d-cloprostenol sódico, 300 UI de gonodotrofina coriônica equina (eCG) via IM e 1,0 mg de cipionato de estradiol (ECP). A CFA de cada animal foi determinada após exame ultrassonográfico com transdutor linear transretal de 5 MHz. O par de ovários (direito e esquerdo) foi avaliado e o número total de folículos antrais ( $\geq 3$  mm de diâmetro) foi mensurado por animal no dia do início do protocolo. Os animais foram divididos em grupos de alta ( $\geq 30$ ), intermediária (15 a 25) e baixa ( $\leq 10$ ) CFA. O diagnóstico de gestação foi realizado em todos os animais 30 dias após a data da inseminação. O número de folículos foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis e a taxa de concepção foi analisada pelo teste de Qui-quadrado. Apesar da ausência de diferença estatística entre as taxas de concepção obtidas nas categorias de baixa (57,43%; 174/303), intermediária (50 %; 157/314) e alta (47,9%; 57/119) CFA, houve uma tendência ( $p = 0,09$ ) do grupo de baixa contagem apresentar maior taxa de concepção em relação ao de alta CFA. Pode-se concluir que vacas *Bos indicus* submetidas à IATF não sofreram influência da população de folículos antrais na taxa de concepção, indicando que a baixa CFA não é responsável por níveis inferiores de fertilidade e que a CFA não deve ser considerada como única ferramenta para a seleção de fêmeas do rebanho.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva, prenhez, IATF, Oócitos, Inseminação artificial.



MORAES, Fábio Lucas Zito. **Influence of antral follicles count on conception rate of fixed-time inseminated cows.** 2016. 48 p. Dissertação Mestrado Acadêmico em Saúde e Produção de Ruminantes – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, 2016.

The aim of this study was to evaluate the influence of antral follicles count (AFC) on conception rates in cows subjected to artificial insemination in fixed time (FTAI). A total of 736 Zebu females were used with body condition score (BCS) ranging from 2.5 to 3.5 (scale 1-5). The animals were destined to IATF and subjected to a standard protocol for synchronization of ovulation in a random day of the estrous cycle called D0, with insertion of an intravaginal device containing 0.588 g P4 in association with the application of 2.0 mg of oestradiol benzoate intramuscularly (IM). After 8 days (D8), P4 was removed and the administration of 150 ug of sodium D-cloprostenol, 300 IU of equine chorionic gonadotrofina (eCG) IM and 1.0 mg estradiol cypionate (ECP) was performed. The AFC from each animal was determined by ultrasonography through a linear transrectal transducer of 5 MHz. The pair of ovaries (right and left) was evaluated and the total number of antral follicles ( $\geq 3$  mm in diameter) was measured. The animals were divided into groups of high ( $\geq 30$ ), intermediate (15 to 25) and low ( $\leq 10$ ) AFC. Pregnancy diagnosis was performed in all animals 30 days after the date of insemination. The number of follicles was analyzed by Kruskal-Wallis test and the conception rate was analyzed by chi-square test. Despite the lack of statistical difference between conception rates obtained from low (57.43%, 174/303), intermediate (50%; 157/314) and high (47.9%; 57/119) AFC groups, there was a trend ( $p = 0.09$ ) in the low AFC group to have higher conception rates compared to the high AFC group. It can be concluded that pregnancy rates from *Bos indicus* cows subjected to the FTAI are not influenced by the population of antral follicles, indicating that the low AFC is not responsible for lower levels of fertility and that AFC should not be utilized as a unique tool for selecting females in the herd.

**Keywords:** Reproductive Efficiency, Pregnancy, FTAI, Oocytes, Artificial Insemination

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 9  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 11 |
| 2.1      | O OVÁRIO EM MAMÍFEROS .....   | 11 |
| 2.1.1    | Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário.....                              | 11 |
| 2.1.2    | População Folicular Ovariana.....   | 11 |
| 2.1.3    | Folículo-logênese .....   | 12 |
| 2.2      | FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL.....   | 13 |
| 2.2.1    | O Ciclo Hormonal.....   | 13 |
| 2.2.2    | Dominância Folicular Ovariana no Ciclo Estral.....                              | 15 |
| 2.3      | IMPORTÂNCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO<br>(IATF) NA PECUÁRIA ..... | 16 |
| 2.4      | DIFERENÇAS ENTRE ANIMAIS <i>Bos indicus</i> E <i>Bos taurus</i> .....           | 16 |
| 2.5      | CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (CFA).....  | 17 |
| 2.6      | ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL .....   | 20 |
| <b>3</b> | <b>HIPÓTESE</b> .....   | 22 |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 23 |
| 4.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 23 |
| 4.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 23 |
| <b>5</b> | <b>ARTIGO</b> .....   | 24 |
| <b>6</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 30 |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 36 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 37 |

## 1 INTRODUÇÃO

Recentemente tem se verificado um grande aumento no uso da Inseminação Artificial (IA) no Brasil, em grande parte devido ao conhecimento e popularização das técnicas de sincronização da ovulação (Rodriguez et al., 2013b). De acordo com Baruselli et al. (2012), a técnica de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é apontada como grande responsável pelo aumento do número de vacas, proporcionando altas taxas de prenhez e redução de perdas devido ao anestro pós-parto e por falhas na detecção do estro.

Vacas zebuínas apresentam de três a quatro ondas de crescimento folicular (Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000), enquanto em taurinas é descrita maior incidência de duas a três ondas por ciclo estral (Ginther et. al., 1989; Wolfenson et al., 2004). Em cada onda de crescimento folicular, animais de sangue zebuíno também apresentam maior quantidade de folículos antrais quando comparados aos animais de sangue *taurus* (Carvalho et al., 2008).

A contagem de folículos antrais tem sido objeto de muitas pesquisas no meio acadêmico devido a sua influência direta nos resultados obtidos a partir da utilização das biotécnicas reprodutivas (Ireland et al., 2011; Rico et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014 a, b), em especial a produção *in vitro* de embriões (Pontes et al. 2009, 2010, 2011).

Ireland et al. (2007, 2008), apontam a ocorrência de repetibilidade da população de folículos antrais no mesmo animal se avaliado em períodos diferentes, mesmo quando avaliado em ciclos estrais consecutivos (Oliveira Junior, 2013). No entanto, existe variação na população de folículos antrais entre os animais de uma mesma subespécie (Burns et al., 2005). Esta variabilidade na CFA entre indivíduos pode ser mensurada e classificada, por exemplo, como alta, intermediária e baixa (Santos et al., 2012, 2013; Mendonça et al., 2013, Rodrigues et al, 2013 b).

Sabe-se ainda, que dentre outros fatores, como a condição nutricional corporal e sanitária dos animais, a alta CFA também está diretamente relacionada a maiores taxas de prenhez em vacas taurinas (Cushman et al., 2009; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). Entretanto, resultados obtidos com animais *Bos indicus* apresentam-se contraditórios no que diz respeito a tal correlação (Rodrigues, et.al, 2013 b; Santos et al., 2013; Morotti et al., 2015). Nesse contexto, mais pesquisas se fazem necessárias

com animais *Bos indicus* para investigar essa relação e uma possível predição de sua influência nas taxas de produção quando associada a outras biotécnicas.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da população folicular antral na taxa de concepção de vacas zebuínas submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O OVÁRIO EM MAMÍFEROS

#### 2.1.1 Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário

O ovário é um órgão complexo composto pelas regiões cortical e medular, circundado pelo epitélio germinativo sobre a membrana basal. Abaixo da membrana basal, encontra-se a túnica albugínea e o estroma ovariano (Murdoch, 1996). Na região cortical encontram-se diferentes tipos celulares como células da teca, do estroma, do epitélio da superfície ovariana e oócitos. Tais células posteriormente sofrem diferenciação, como é o caso das células da teca, que se desenvolvem em camadas externa e interna e das células da granulosa, que se diferenciam em células do cúmulus, murais ou luteais (Erickson; Shimasaki, 2003).

A região mais interna do ovário, denominada medular, constitui-se por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido conjuntivo (fibroblastos, fibronectina e fibras de colágeno tipos I e III), sendo responsável pela nutrição do ovário (Hafez; Hafez, 2004). Na região cortical, que é constituída por terminações nervosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibroblastos e fibras de colágeno tipos I e III (Hafez; Hafez, 2004), encontram-se corpos hemorrágicos, corpos lúteos, corpos albicans e folículos quiescentes, em atresia ou em desenvolvimento (Murdoch, 1996).

No bovino, o ovário apresenta dimensões que variam de 3,0 a 4,5 cm de comprimento, e 1,0 a 2,0 cm de largura, pesando 10 a 20 gramas. Apresenta função endócrina ou esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteroides e peptídeos) e exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos; Hafez; Hafez, 2004).

#### 2.1.2 População Folicular Ovariana

Em vacas, existe uma variação individual da população folicular entre 0 a 720.000 folículos por ovário (Erickson, 1996) que pode ser influenciada por fatores como espécie, raça (Cahill et. al., 1979), genética (Smith et al., 1994), idade, níveis hormonais (Treacy, 1993), além do status reprodutivo, sanitário e clínico do animal (Erickson, 1966; Betteridge, 1989).

Estima-se que, ao nascimento, a população folicular ovariana seja de 235.000 folículos por vaca (Betteridge, 1989). Em ovários de fêmeas bovinas de diferentes idades e raças, a população folicular pré-antral para vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente, é de aproximadamente 143.930 e 285.150 folículos para fetos, 76.850 e 109.670 folículos para novilhas e 39.440 e 89.570 folículos (Silva-Santos et al., 2011).

Os ovários possuem um pool de folículos primordiais, responsáveis pela renovação contínua da população folicular (Guilbault et al., 1986) representando 90% do total de folículos (Saumande, 1991). Contudo, cerca de 99,9% dos folículos presentes nesse pool, não chegam até a ovulação (Carrol et al., 1990), sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia.

### 2.1.3 Folículo-gênese

A folículo-gênese é um processo fisiológico que rege os processos desde o início na formação do folículo primordial até o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo pré-ovulatório (Saumande, 1981).

O folículo, que é composto por um oócito envolto por uma ou mais camadas de células somáticas, pode apresentar ou não uma cavidade antral preenchida por líquido folicular, conforme o estágio de desenvolvimento (Figueiredo et al., 2002; Seneda et al., 2008; Aerts; Bols, 2010). Tais estruturas são classificadas como folículos não cavitários ou pré-antrais (quando primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (quando terciários e pré-ovulatórios; Figueiredo et al., 2002; Seneda et al., 2008; Aerts; Bols, 2010).

A transição de primordial para primário é caracterizado pela ativação e crescimento do folículo, que se encontrava em quiescência desde o período fetal, ocorrendo a proliferação e diferenciação das células da granulosa de achatadas para células cuboides (Hulshof et al., 1994). No desenvolvimento do folículo secundário, ocorre o aumento do tamanho do oócito, formação e caracterização da zona pelúcida, surgimento das primeiras células da teca (Van den Hurk et al., 2000) e aumento do número de camadas das células da granulosa (Hulshof et al., 1994). Ao fim deste estágio, já pode ser detectada a ação das gonadotrofinas (Van Den Hurk et al., 2000).

Com o desenvolvimento folicular, ocorre a formação da cavidade antral (Adams; Jaiswal, 2008; Aerts; Bols, 2010). Folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios) são caracterizados por um oócito circundado pela zona pelúcida, envolto pela corona radiata

e pelas células do *cumulus*, que por sua vez conectam o oócito às várias camadas de células da granulosa. Possuem ainda uma cavidade antral contendo líquido folicular e duas camadas de células tecais (teca interna e teca externa; Gordon 1994; Aerts; Bols, 2010).

O desenvolvimento folicular antral, diferentemente dos folículos pré-antrais, apresenta produção e liberação de hormônios esteroides e outros peptídeos, e também forte dependência da ação de gonadotrofinas e hormônios esteroides (Seneda et al., 2010), que atuam por mecanismos parácrinos (essenciais para a manutenção da viabilidade oocitária) e endócrinos (Ginther et al., 2001; Figueiredo et al., 2002; Fortune et al., 2004;)

## 2.2 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL

### 2.2.1 O Ciclo Hormonal

Os bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) são animais poliéstricos anuais que exibem comportamento de cio a cada 21 dias, aproximadamente (Roche, 1996). A atividade cíclica ovariana, com início na puberdade, é o mecanismo responsável por permitir que as fêmeas em período reprodutivo demonstrem receptividade ao macho, aceitem o acasalamento e conseqüentemente, mantenham a gestação (Forde et al., 2011).

Nos bovinos, os hormônios hipotalâmicos (hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH), hipofisários (FSH e LH), ovarianos (Progesterona - P4, Estradiol - E2 e Inibinas) e uterinos (Prostaglandina - PGF<sub>2α</sub>) regulam as funções ovarianas (recrutamento e crescimento folicular, ovulação, luteinização e luteólise) por meio de um sistema de *feedback* positivo e negativo (Roche, 1996; Crowe, 2008; Forde et al., 2011).

No decorrer do ciclo estral, acontecem duas ou três ondas de crescimento folicular ovariana (Ginther et al., 1989), com emergência de um grupo de folículos, seleção de um folículo dominante (FD) e ovulação ou atresia do mesmo (Forde et al., 2011).

Dois fases estão presentes no ciclo estral dos bovinos: fase lútea ou progesterônica (metaestro e diestro), iniciando logo após a ovulação com duração de 14 a 18 dias, caracterizada pela presença do corpo lúteo (CL); e fase folicular ou

estrogênica (pró-estro e estro), com duração de 4 a 6 dias, ocorrendo após o desaparecimento do CL (luteólise) até o momento da ovulação onde acontece a maturação final e a ovulação do folículo pré-ovulatório (Forde et al., 2011).

Fisiologicamente, o GnRH atua sobre a hipófise anterior ou adeno-hipófise, promovendo a liberação de gonadotrofinas produzidas na hipófise posterior ou neuro-hipófise (Forde et al., 2011). Após seu transporte via sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, o GnRH se liga aos receptores de superfície celular e sinaliza a liberação de FSH e LH (Youngquist; Threlfall, 2007). No citoplasma, grânulos secretores armazenam FSH (hormônio folículo estimulante) por curtos períodos de tempo, enquanto o LH (hormônio luteinizante) é armazenado por períodos mais longos do ciclo estral (Farnworth, 1995).

Na fase denominada folicular, quando os níveis de P4 estão basais decorrente da ausência do CL, ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de E2 pelo aumento do diâmetro do FD, levando assim à maior liberação de GnRH e manifestação do comportamento do estro, caracterizado pela aceitação da monta (Forde et al., 2011).

A ovulação ocorre em resposta a um aumento da frequência dos pulsos de LH, cerca de 10 a 14 horas após o estro. Em seguida, ocorre o metaestro, com duração de 3 a 4 dias, caracterizado pela formação do CL a partir do corpo hemorrágico resultante da ovulação do folículo pré-ovulatório (Roche, 1996).

O CL, que é formado pela luteinização das células da granulosa e da teca interna, é responsável pela produção de P4 que mantém a gestação ou o diestro. Nessa fase, as concentrações de P4 permanecem elevadas e os folículos recrutados continuam seu desenvolvimento devido à liberação do FSH pela hipófise anterior. Porém, os folículos recrutados nessa fase não ovulam devido aos pulsos inadequados de LH para a ovulação, devido ao *feedback* negativo desempenhado pelos elevados níveis de P4, sofrendo atresia (Crowe, 2008).

Com a regressão do CL na fase de metaestro, decorrente da secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina, as concentrações de P4 diminuem drasticamente, não ocasionando um *feedback* negativo, possibilitando então a ovulação (Forde et al., 2011).



### 2.2.2 Dominância Folicular Ovariana no Ciclo Estral

A emergência de uma onda de crescimento folicular se inicia com o aumento transitório nas concentrações de FSH e é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos (Sunderland et al., 1994). Neste período correspondente a três dias, existem receptores de FSH localizados nas células da granulosa dos folículos, que permitem ao FSH executar a sinalização, o crescimento e a proliferação celular (Ginther et al., 2002). Tal aumento nas concentrações de FSH, induz o aumento na atividade da enzima aromatase nas células da camada granulosa, responsável por converter andrógeno em estrógeno (Hillier, 1994).

A divergência ou dominância folicular acontece quando ocorre diferença nas taxas de crescimento entre o maior e o segundo maior folículo nos ovários. Esta fase é estabelecida quando o folículo de maior diâmetro atinge aproximadamente 8,5 mm em animais *Bos taurus* (Ginther et al., 1999), 6,1 mm para vacas *Bos indicus* e 5,7 mm para novilhas *Bos indicus* (Sartorelli et al., 2005). O maior folículo continua crescendo enquanto o segundo maior tem seu desenvolvimento reduzido. Nesse momento tem início o processo de atresia (Sartori et al., 2014).

Ainda em desenvolvimento, o FD expande seu diâmetro e promove, no fluido folicular, um aumento nas concentrações de E2 e inibina, suprimindo assim as concentrações de FSH na hipófise anterior por *feedback* negativo e reduzindo a concentrações basais nos níveis de FSH (Sunderland et al., 1994).

O FD selecionado adquire, ao longo do seu desenvolvimento, receptores de LH nas células da granulosa e da teca, continuando seu crescimento frente a concentrações decrescentes de FSH, alternando sua dependência de FSH para LH. Assim, aumentos transitórios de LH na circulação, acabam permitindo que o FD continue produzindo E2 e crescendo, mesmo em um ambiente com menor concentração de FSH (Crowe, 2008; Forde et al., 2011).

Durante a fase lútea inicial, a amplitude e frequência dos pulsos de LH (20 a 30 pulsos/24 horas) ainda são insuficientes para promover a maturação final do FD e a ovulação. Nessa fase, o FD recrutado sofre atresia, e a produção de E2 e inibina diminui, interrompendo o *feedback* negativo sobre a secreção de FSH no hipotálamo/hipófise, causando aumento da secreção de LH e emergência da nova onda de crescimento folicular (FORDE et al., 2011).

Na onda ovulatória, o E2 produzido pelo FD exerce efeito local sobre o desenvolvimento folicular e induz um aumento de GnRH a partir do hipotálamo, promovendo aumento na amplitude e na frequência dos pulsos de LH, causando a maturação final e ovulação do FD (Sunderland et al., 1994; Crowe, 2008)

### 2.3 IMPORTÂNCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) NA PECUÁRIA

Na última década tem-se verificado um grande aumento na utilização da Inseminação Artificial no Brasil, em grande parte devido ao conhecimento e popularização das técnicas de sincronização da ovulação (Rodriguez et al., 2013a). De acordo com Baruselli et al. (2012), a IATF é apontada como grande responsável pelo aumento do número de vacas inseminadas no Brasil. De aproximadamente 212,34 milhões de bovinos existentes em solo brasileiro (IBGE, 2014), criados na sua maioria sob manejo extensivo, estima-se que uma pouca parte seja inseminada, baseando-se no número de doses de sêmen comercializada pelas empresas, cerca de 13.609.311 de doses de sêmen foram vendidas em 2014 (ASBIA, 2014). Desta forma a técnica de IATF se mostra como uma importante alternativa para a redução nas perdas causadas por falha na detecção do estro e pelo anestro pós-parto, que são característicos das vacas *Bos indicus* (Meneghetti et al., 2009; BÓ et al., 2007).

### 2.4 DIFERENÇAS ENTRE ANIMAIS *Bos indicus* E *Bos taurus*

Existem diferenças reprodutivas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que devem ser levadas em consideração quando do emprego de técnicas de manejo, inseminação artificial, transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultrassom aliadas à produção *in vitro* de embriões (Baruselli et al., 2007).

Algumas distinções foram descritas na dinâmica folicular de zebuínos e taurinos. Estudos demonstram diferenças no número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Animais da raça Holandesa apresentam predominantemente ciclo estral de duas e três ondas de crescimento folicular (Savio et al., 1988; Sirois e Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Wolfenson et al., 2004). Em zebuínos, como os da raça Brahman, Nelore e Gir, é descrita maior incidência de 3 ondas, sendo relatada a presença de até 4 ondas de

crescimento folicular por ciclo estral (Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000).

Além da discrepância no número de ondas, Carvalho et al., (2008), descreveram ainda que fêmeas *Bos indicus* recrutam um maior número de folículos antrais (FA) por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* ( $33,4 \pm 3,2$  FA vs  $25,4 \pm 2,5$  FA). Também é observado, em sessões de aspiração folicular, um número mais alto de oócitos recuperados de fêmeas zebuínas (média de 18 a 25 oócitos; Watanabe et al., 1999; Thibier, 2004) do que de taurinas (média de 4 e 14; Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins et al., 2007).

O diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular também é fisiologicamente diferente entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. No primeiro, são descritos diâmetros de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda, respectivamente (Ginther et al., 1989). Já em *Bos indicus*, são relatados diâmetros de 11,3 e 12,1 mm, respectivamente (Figueiredo et al., 1997). Em casos da existência de três ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos foram de 16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1989) e de 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus* (Figueiredo et al., 1997). Portanto, verificam-se diâmetros menores de folículos dominantes e ovulatórios para animais zebuínos quando comparados a taurinos (Martins et al., 2005; Baruseli et al., 2006; 2007;).

Como consequência do menor diâmetro folicular, o corpo lúteo também apresenta menores dimensões em *Bos indicus*, variando de 17 a 21 mm de diâmetro (Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997). Em taurinos, a média é de 20 a 30 mm (Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990). Além disso, Randel (1976) e Segerson et al., (1984), relataram que a concentração de progesterona produzida por gama de tecido luteínico do corpo lúteo (CL) também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos.

## 2.5 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (CFA)

Inicialmente apontada por Burns et. al. (2005) e Ireland et. al. (2007) como possível característica preditiva de fertilidade, a CFA passou a ser alvo de muitos artigos científicos no meio acadêmico.

Por estar relacionada aos resultados obtidos com a aplicação das biotecnologias reprodutivas (Ireland et al., 2011; Rico et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014 a, b), a CFA se mostrou importante no cenário produtivo e na seleção de vacas doadoras de

embriões, principalmente na produção de embriões em larga escala, produzidos por fertilização *in vitro* (PIVE; Pontes et al. 2009, 2010, 2011).

A CFA ainda foi correlacionada com a quantidade da reserva folicular ovariana em *Bos taurus* (Cushman et al., 2009; Ireland et al., 2011), o que não se verificou em *Bos indicus* (Silva-Santos et al., 2011 e Rosa et al., 2013). Algumas características morfológicas, como tamanho e dimensão do útero, da vulva e dos ovários também foram relacionadas com a CFA. Conde et al. (2013), por exemplo, encontraram relação positiva entre CFA e diâmetro uterino em fêmeas bovinas.

Em taurinos e mestiços a CFA foi relacionada à qualidade oocitária e embrionária (Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2014), a uma menor capacidade de síntese de progesterona e a um crescimento endometrial inferior nas fêmeas que apresentavam um número significativamente baixo de folículos antrais (Jimenez-Krassel et al., 2009).

Recentemente, avaliando uma possível relação entre CFA, diâmetro do folículo ovulatório e corpo lúteo em vacas *Bos indicus*, Morotti et al. (2014) não encontraram diferença nas vacas com alta CFA ( $\geq 40$ ) quando comparadas com baixa CFA ( $\leq 10$ ), embora as vacas com alta CFA tenham apresentado ovários com maiores dimensões.

Posteriormente, Mossa et al. (2012) encontrou resultados da influência da CFA sobre a fertilidade das vacas Holandesas submetidas a programas de inseminação artificial, a partir da observação e identificação do cio.

Em consequência, estudos realizados com *Bos taurus* têm relacionado maiores índices de prenhez a taxas mais elevadas de CFA (Cushman et al., 2009; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). Contrapondo alguns estudos realizados com *Bos taurus*, Mendonça et al. (2013) e Santos et al. (2014) trabalhando com *Bos indicus* e animais meio-sangue não observaram a mesma correlação entre prenhez e CFA. Ainda, Santos et al. (2013) encontraram maiores taxas de concepção em vacas com baixa CFA, evidenciando que os resultados ainda não demonstram a mesma correlação em *Bos indicus* (Morotti et al., 2015), quando comparado a *Bos taurus*.

Apesar da relativa escassez de estudos quanto ao efeito do número de folículos antrais sobre os resultados de biotécnicas como a IATF em fêmeas Nelore, Baruselli et al., (2012), Evans et al., (2012) e Morotti et al., (2015), apontam a seleção de fêmeas pela CFA como uma possibilidade de se incrementar os índices de prenhez à IATF em bovinos.

Segundo Burns et al. (2005), existe uma variabilidade na população de folículos antrais entre os animais, porém é observada uma repetibilidade da CFA no mesmo animal se avaliado em períodos diferentes (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008). O mesmo se confirmou por Oliveira Junior et. al., (2013), que não encontraram diferença no número folículos antrais em três ciclos estrais consecutivos.

Como critério para seleção de vacas leiteiras, foi atribuída à CFA um efeito hereditário, classificado como de maior herdabilidade ( $0.31 \pm 0.14$  e  $0.25 \pm 0.13$  para vacas e novilhas, respectivamente) entre as medidas tradicionais de fertilidade, sendo também influenciado pelo status de lactação e qualidade do leite, embora não seja afetada pela produção leiteira (Walsh et al., 2014).

A variabilidade na CFA entre indivíduos é usualmente citada na literatura como alta, intermediária e baixa contagem, como ilustrado no Quadro 1 e 2, que também demonstra a taxa de concepção relacionada às contagens de folículos antrais alta, intermediária e baixa

**Quadro 1.** Classificação da população folicular de vacas zebuínas e taurinas em alta, intermediária e baixa contagem de folículos antrais, relatadas por outros grupos de pesquisadores.

| Autoria               | Subespécie                       | CFA média    | CFA        |               |            |
|-----------------------|----------------------------------|--------------|------------|---------------|------------|
|                       |                                  |              | Alta       | Intermediária | Baixa      |
| Rodrigues et al. 2015 | <i>Bos indicus</i>               | 44,27±0,89   | ≥ 48       | 32 a 48       | ≤ 32       |
| Burns et al. 2005     | <i>Bos taurus</i>                | 21,5         | ≥ 25       | 16 a 24       | ≤ 15       |
| Ireland et al. 2011   | <i>Bos taurus</i><br>(Holandesa) | 21,5         | ≥ 25       | 16 a 24       | ≤ 15       |
| Santos et al. 2014    | <i>Bos indicus</i>               | 17,93±8,45   | ≥ 25       | 11 a 24       | ≤ 10       |
| Baruselli et al. 2015 | <i>Bos indicus</i><br>(vacas)    | 40.0 ± 0.7   | 56.3 ± 1.4 | 39.2 ± 0.9    | 24.5 ± 0.5 |
| Baruselli et al. 2015 | <i>Bos indicus</i><br>(novilhas) | 11.8 ± 0.2   | 17.2 ± 0.2 | 11.3 ± 0.1    | 7.1 ± 0.1  |
| Rosa et al. 2015      | <i>Bos indicus</i>               | 61,14 ±30,43 | ≥ 92       | 46 a 76       | ≤ 31       |
| Santos et al. 2016    | <i>Bos indicus</i>               | 19,6± 10,7   | 30,7± 6,5  | 18,6± 1,6     | 7,8± 2,4   |

**Quadro 2.** Taxa de concepção de zebuínos de acordo com a contagem de folículos antrais alta, intermediária e baixa, relatadas por diferentes pesquisadores.

| Autor                 | Subespécie                       |         | Contagem de folículos antrais |                |                |
|-----------------------|----------------------------------|---------|-------------------------------|----------------|----------------|
|                       |                                  |         | Alta                          | Média          | Baixa          |
| RODRIGUES et al. 2015 | <i>Bos indicus</i>               | CFA     | $\geq 48$                     | 32 a 48        | $\leq 32$      |
|                       |                                  | Prenhez | 31,2%                         | 30,9%          | 35,9%          |
|                       |                                  | N       | 68/218                        | 53/171         | 74/206         |
| SANTOS et al. 2014    | <i>Bos indicus</i>               | CFA     | $\geq 25$                     | 11 a 24        | $\leq 10$      |
|                       |                                  | Prenhez | 51,7%                         | 48%            | 60,5%          |
|                       |                                  | n       | 77/149                        | 142/400        | 92/152         |
| BARUSELI et al. 2015  | <i>Bos indicus</i><br>(vacas)    | CFA     | $56.3 \pm 1.4$                | $39.2 \pm 0.9$ | $24.5 \pm 0.5$ |
|                       |                                  | Prenhez | 45,5%                         | 53,6%          | 47,1 %         |
|                       |                                  | n       | 115/253                       | 134/250        | 120/255        |
| BARUSELI et al 2015   | <i>Bos indicus</i><br>(novilhas) | CFA     | $17.2 \pm 0.2$                | $11.3 \pm 0.1$ | $7.1 \pm 0.1$  |
|                       |                                  | Prenhez | 36,7%                         | 36,4%          | 39,6%          |
|                       |                                  | n       | 136/371                       | 135/371        | 143/371        |
| SANTOS et al. 2016    | <i>Bos indicus</i>               | CFA     | $30,7 \pm 6,5$                | $18,6 \pm 1,6$ | $7,8 \pm 2,4$  |
|                       |                                  | Prenhez | 51,9%                         | 48,6%          | 58,5%          |
|                       |                                  | n       | 95/183                        | 89/183         | 106/181        |

## 2.6 ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

O monitoramento da situação nutricional da vaca pode ser feito mediante a atribuição de escores de condição corporal (ECC). É uma ferramenta importante como avaliação do balanço energético do rebanho (Machado et al., 2008), sendo, atualmente, mais utilizada em uma escala de 1 a 5, onde 1 representa vaca extremamente magra e 5 para vaca extremamente gorda (Santos et al., 2010).

Para Pryce et al., (2001), o gerenciamento pré-determinado do ECC do rebanho é uma boa estratégia para se obter um maior controle do desempenho reprodutivo. Embora a medida de ECC ainda seja assunto pouco abordado nos índices de seleção (Forni et al., 2007; Faria et al., 2009a), para a reprodução ele pode indicar a capacidade da vaca em emprenhar nas próximas estações, uma vez que a taxa de concepção é afetada negativamente pelo baixo ECC ao parto (Santos et al., 2009).

Sabe-se que para cada unidade de aumento do ECC ao parto, reduz-se em 28 dias o período puerperal da fêmea (Lalman et al., 1997). Entretanto, o ECC deve ser considerado um dos principais fatores envolvidos na habilidade reprodutiva do rebanho, devendo também ser levados em consideração, e não só o status hormonal e ovulatório das vacas (Sartori et al., 2004; Montiel e Ahuja, 2005).

### **3 HIPÓTESE**

A alta contagem de folículos antrais exerce efeito positivo nos resultados de concepção e prenhez de fêmeas *Bos indicus*.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar a contagem de folículos antrais (CFA) em fêmeas bovinas submetidas a protocolo de sincronização da ovulação.

- Avaliar o escore de condição corporal (ECC) e correlacionar a taxa de concepção das categorias, alta, média e baixa CFA com o ECC das vacas submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

- Classificar as fêmeas com CFA estimada em três categorias (alta, intermediária e baixa CFA) e correlacionar as taxas de concepção à inseminação artificial em tempo fixo, com as categorias alta, média e baixa CFA.

## 5 ARTIGO

### **Influência da Contagem de Folículos Antrais na Taxa de Concepção de Vacas Inseminadas em Tempo Fixo.**

#### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da contagem de folículos antrais (CFA) sobre as taxas de concepção em vacas na inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 736 fêmeas zebuínas, com escore de condição corporal (ECC) variando de 2,5 a 3,5 (escala 1-5). Os animais foram destinados à IATF e submetidos a um protocolo padrão de sincronização da ovulação em um dia aleatório do ciclo estral denominado D0, com a inserção de dispositivo intravaginal contendo 0,588 g de P4 em associação à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol pela via intramuscular (IM). Após 8 dias (D8), houve remoção do implante de P4, administração de 150 µg de d-cloprostenol sódico, 300 UI de gonodotrofina coriônica equina (eCG) via IM e 1,0 mg de cipionato de estradiol (ECP). A CFA de cada animal foi determinada, no D0, após exame ultrassonográfico com transdutor linear transretal de 5 MHz. O par de ovários (direito e esquerdo) foi avaliado e o número total de folículos antrais ( $\geq 3$  mm de diâmetro) foi mensurado. Os animais foram divididos em grupos de alta ( $\geq 30$ ), intermediária (15 a 25) e baixa ( $\leq 10$ ) CFA. O diagnóstico de gestação foi realizado em todos os animais 30 dias após a data da inseminação. O número de folículos foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis e a taxa de concepção foi analisada pelo teste de Qui-quadrado. Apesar da ausência de diferença estatística entre as taxas de concepção obtidas nas categorias de baixa (57,43%; 174/303), intermediária (50 %; 157/314) e alta (47,9%; 57/119) CFA, houve uma tendência ( $p = 0,09$ ) do grupo de baixa contagem apresentar maior taxa de concepção em relação ao de alta CFA. Pode-se concluir que vacas *Bos indicus* submetidas à IATF não sofrem influência da população de folículos antrais na taxa de concepção, indicando que a baixa CFA não é responsável por níveis inferiores de fertilidade e que a CFA não deve ser considerada como única ferramenta para a seleção de fêmeas do rebanho.

**Palavras-chave:** eficiência reprodutiva, prenhez, IATF, taxa de concepção, Inseminação artificial.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a necessidade de se produzir indivíduos de alto potencial genético tem aumentado exponencialmente na bovinocultura leiteira e de corte. Não obstante, a partir do conhecimento mais profundo da fisiologia do ciclo estral e da utilização de estratégias farmacológicas para controle e sincronização da ovulação em vacas, a utilização de biotécnicas como a IATF, tem possibilitado o suprimento eficiente de tal demanda (Baruselli et al., 2002).

Recentemente, a contagem de folículos antrais (CFA) tem sido objeto de estudo devido a sua relação direta nos resultados obtidos na utilização das biotecnologias reprodutivas (Ireland et al., 2011; Rico et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014 a, b), como a IATF e a produção de embriões bovinos. Além de determinar quantitativamente a disponibilidade de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, a população folicular também pode exercer influência qualitativa sobre a produção embrionária.

Sabe-se que, em vacas taurinas, a alta CFA está diretamente relacionada a maiores índices de prenhez e maior eficiência na inseminação artificial e na produção de embriões (Cushman et al., 2009; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). Entretanto, trabalhando com animais *Bos indicus*, os resultados apresentados não confirmam tal relação de positividade entre a CFA e as taxas de concepção das vacas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (Rodrigues, et.al, 2013 b; Santos et al., 2013; Morotti et al., 2015).

Diversas distinções foram descritas na fisiologia da dinâmica folicular em animais zebuínos e taurinos. Além da população de folículos antrais por onda de crescimento, o número de ondas foliculares também é maior em fêmeas *indicus* que em fêmeas *taurus*, enquanto o diâmetro máximo de folículos dominantes é menor em comparação aos de taurinas (Lunardelli et al., 2013).

A vacas *Bos indicus*, criadas em manejo extensivo e na condição de pós-parto, apresentam baixa condição de escore corporal (ECC), que pode influenciar negativamente a taxa de concepção (Santos et al., 2009). Para Sartori et. al, (2004) e Montiel e Ahuja (2005) o efeito do ECC deve ser considerado como importante efeito na habilidade reprodutiva do rebanho além do status hormonal e das vacas.

Nesse contexto, mais pesquisas se fazem necessárias com animais *Bos indicus* para investigar essa relação e uma possível predição de sua influência nas taxas de concepção e produção, quando associada a outras biotécnicas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da população folicular antral na taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais*

O presente estudo foi realizado de acordo com o Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, com base na Lei Federal nº 11.794 de 08 de outubro de 2008.

Foram utilizadas 736 fêmeas zebuínas, recém-paridas (antes dos 40 dias pós-parto), de uma propriedade rural localizada na cidade de Pirajuí, São Paulo, latitude: 21° 59' 55" S, longitude: 49° 27' 26" W), à 486 metros de altitude. Todas os animais eram criados em regime de pastagem (*Brachiaria brizantha*) e com fornecimento de sal mineral *ad libitum*, com escore de condição corporal (ECC) variando de 2,5 a 3,5 (escala 1- 5; Machado et al., 2008).

Todos os animais foram destinados à inseminação artificial em tempo fixo e submetidos a um protocolo padrão de sincronização da ovulação iniciado em um dia aleatório do ciclo estral denominado D0.

### *Delineamento experimental*

Vacas zebuínas (n = 736), com idade variando entre 36 e 96 meses, na condição de recém-paridas, foram classificadas de acordo com a sua população folicular ovariana e divididas em grupos de alta (n = 119), intermediária (n = 314) e baixa (n = 303) contagem de folículos antrais e submetidas à inseminação artificial em tempo fixo com o mesmo protocolo de sincronização da ovulação. A CFA foi realizada no momento do início do protocolo de IATF, assim com a avaliação do escore de condição corporal. O diagnóstico de gestação foi realizado em todos os animais 30 dias após a data da inseminação.

### *Contagem de folículos antrais*

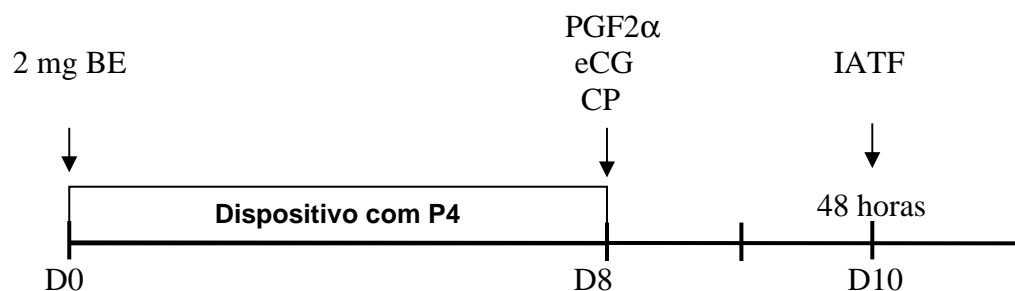
A CFA de cada animal foi determinada no momento do início do protocolo de IATF, após exame ultrassonográfico com transdutor linear transretal de 5 MHz (Aloka SSD-500, Aloka Co. Ltda., Tóquio, Japan). O par de ovários (direito e esquerdo) foi avaliado e o número total de folículos antrais, a partir de 3 mm de diâmetro, foi mensurado por par de ovários, como descrito anteriormente (Burns, et. al., 2005; Ireland, et al., 2008).

Para padronizar a contagem dos folículos, cada face do ovário foi analisada a partir da extremidade para o pedículo, a fim de identificar com maior precisão o número de folículos antrais.

Após a contagem, os animais foram distribuídos entre os grupos de alta ( $\geq 30$  folículos), intermediária (15 a 25 folículos) e baixa ( $\leq 10$  folículos) CFA para posterior comparação com suas respectivas taxas de concepção aos 30 dias.

#### *Protocolo hormonal*

O início do protocolo foi estabelecido em um dia aleatório do ciclo estral (D0) com a inserção de dispositivo intravaginal contendo 0,588g de P4 (Cronipres® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Argentina) em associação à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Argentina) via intramuscular (IM). Após 8 dias (D8), foi realizada a remoção da P4 e a administração de 150 $\mu$ g de d-cloprostenol sódico (Croniben Biogénesis Bagó, Argentina), 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 1,0mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil) via IM, conforme ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática do protocolo de sincronização da ovulação utilizado em fêmeas bovinas zebuínas.

A inseminação artificial foi realizada 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4, com sêmen criopreservado proveniente de centrais de produção e comercialização de sêmen que seguem os padrões mínimos de qualidade estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA; Henry e Neves, 1998).

O descongelamento do sêmen foi realizado a 36°C, por 20 segundos, fazendo uso de um descongelador que mantém a temperatura estável (Descongelador de Sêmen e Embriões – WTA®, WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo profissional.

### *Diagnóstico de gestação*

Para diagnóstico da gestação, as vacas foram submetidas à ultrassonografia transretal e a prenhez foi confirmada pela visualização da vesícula embrionária, com presença de feto viável (batimento cardíaco). A taxa de concepção foi calculada a partir do total de vacas gestantes sobre o total de vacas inseminadas.

### *Análise estatística*

Para divisão dos grupos, o número médio (M) e o desvio padrão (DP) foram extraídos da população total de folículos antrais das 736 vacas incluídas neste estudo. As vacas de baixa contagem foram definidas com base na média populacional ( $\approx 17$  folículos) subtraído por 1 DP ( $\approx 12$  folículos) ou seja, baixa CFA  $\leq 10$  folículos ( $n = 303$ ). As vacas que apresentaram CFA com valores entre  $\geq 15$  e  $\leq 25$  folículos, constituíram o grupo de intermediária CFA ( $n = 314$ ). O grupo de alta CFA foi definido com base na média populacional ( $\approx 17$  folículos) acrescido de 1 DP ( $\approx 12$  folículos + 17 folículos; Alta CFA  $\geq 30$  folículos;  $n = 119$ ).

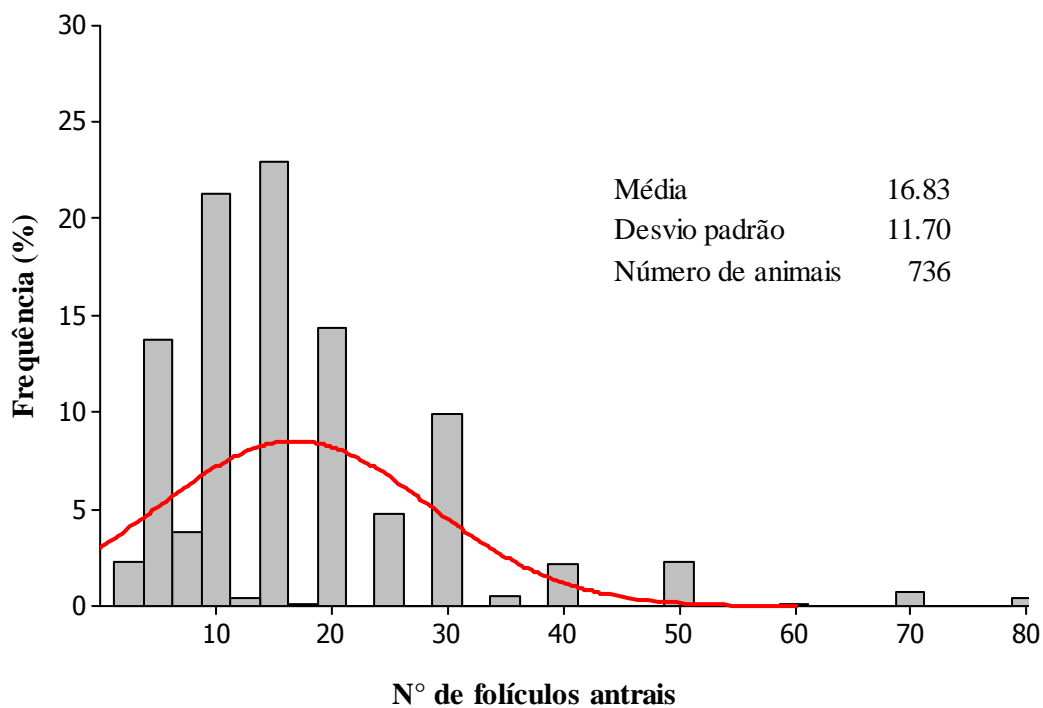
A contagem de folículos antrais não apresentou um padrão de distribuição normal, portanto a CFA entre os grupos (baixa, intermediária e alta contagem) foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis. Esses valores estão apresentados como média e desvio padrão da média ( $M \pm DP$ ).

A variável categórica nominal (taxa de concepção) foi analisada pelo teste de Qui-quadrado, seguido de comparações aos pares para se determinar a diferença entre os grupos. Para apresentação destas variáveis, os dados foram expressos como proporções.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab® 16.1.1, adotando um nível de significância quando  $p$  for  $\leq 0,05$ .

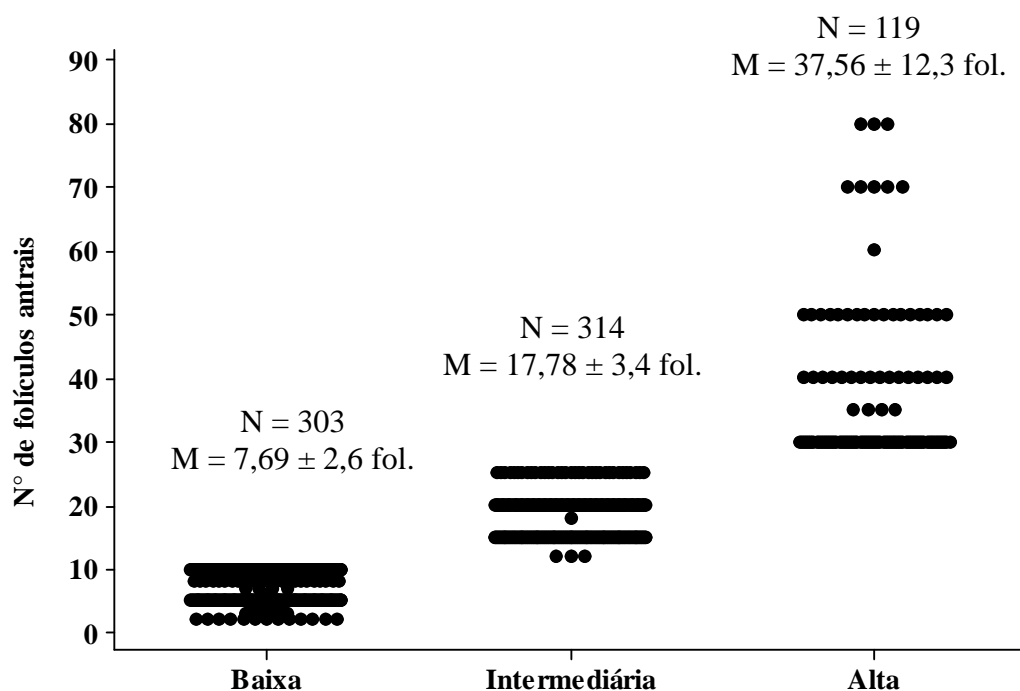
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência e distribuição do número de folículos antrais observados no presente estudo encontram-se ilustradas nas figuras 2 e 3.



**Figura 2** – Frequência de distribuição das contagens de folículos antrais (CFA) de fêmeas zebuínas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo.





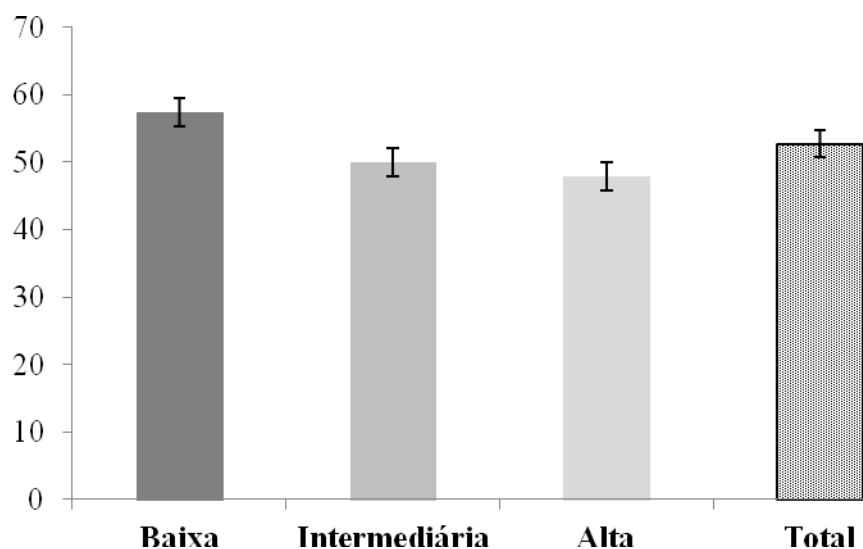
**Figura 3** – Distribuição do número de folículos antrais de vacas Nelore com baixa, intermediária e alta contagem de folículos antrais (CFA) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo.

Não houve diferença estatística entre as taxas de concepção obtidas nas categorias de baixa ( $\leq 10$ ), intermediária (15 a 25) e alta CFA ( $\geq 30$ ). Houve uma tendência ( $p = 0,09$ ) do grupo de baixa contagem em apresentar maior taxa de concepção em relação ao de alta CFA (Tabela 1 e Figura 4).

**Tabela 1** – Taxa de concepção de vacas com Baixa ( $\leq 10$  folículos), Intermediária (11 a 29 folículos) e Alta ( $\geq 30$  folículos) contagem de folículos antrais (CFA) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo.

| Grupos de CFA     | CFA<br>Média $\pm$ DP         | Taxa de<br>concepção<br>% | (Prenhez/Inseminadas) |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Baixa CFA         | 7,81 $\pm$ 2,6 <sup>c</sup>   | 57,43                     | (174/303)             |
| Intermediária CFA | 17,59 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>  | 50,00                     | (157/314)             |
| Alta CFA          | 35,52 $\pm$ 10,5 <sup>a</sup> | 47,90                     | (57/119)              |
| Total / Média     | 16,83 $\pm$ 11,7              | 52,72                     | (388/736)             |
| Valor de p        | 0,001                         | 0,09                      |                       |

<sup>a, b, c</sup> - Valores seguidos de letras diferentes dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (Baixa, Intermediária e Alta CFA).



**Figura 4** - Taxa de concepção de vacas com Baixa ( $\leq 10$  folículos), Intermediária (15 a 25 folículos) e Alta ( $\geq 30$  folículos) contagem de folículos antrais (CFA) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo.

A taxa de concepção das vacas não sofreu influência dos diferentes escores de condição corporal quando submetidas à inseminação artificial em tempo fixo ( $p = 0.877$ ; Tabela 2).

**Tabela 2** – Efeito do escore de condição corporal (ECC) sobre a taxa de concepção de vacas Nelore com Baixa ( $\leq 10$  folículos), Intermediária (15 a 25 folículos) e Alta ( $\geq 30$  folículos) contagem de folículos antrais (CFA), submetidas à inseminação artificial em tempo fixo.

| ECC                 | Baixa                          | Intermediária                  | Alta                          | Total           |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| <b>2 a 2.5</b>      | 51.72 <sup>a, A</sup> (87/159) | 51.13 <sup>a, A</sup> (68/133) | 60.87 <sup>a, A</sup> (28/46) | 54.14 (183/338) |
| <b>3 a 3.5</b>      | 59.55 <sup>a, A</sup> (81/136) | 48.29 <sup>a, B</sup> (85/176) | 38.03 <sup>b, B</sup> (27/71) | 50.39 (193/383) |
| <b>Média /Total</b> | 56.95 (168/295)                | 49.51 (153/309)                | 47.01 (55/117)                | 52.15 (376/721) |

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0.05$ ) entre os escores de condição corporal. Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0.05$ ) entre os grupos de contagem folicular (Baixa, Intermediária e Alta CFA).

A contagem de folículos antrais apresenta uma grande variedade entre os trabalhos realizados com animais *Bos indicus*, onde são descritos valores para alta CFA entre  $56.3 \pm 1.4$  (Baruselli et al., 2015) e  $\geq 25$  (Santos et al., 2014), e para baixa CFA entre  $24,5 \pm 0,5$  (Baruselli et al., 2015) e  $\leq 10$  (Santos et al., 2014). Em nosso trabalho os valores

atribuídos para cada categoria de CFA (Baixa:  $\leq 10$  folículos; Intermediária: 15 a 25 folículos e Alta:  $\geq 30$  folículos), foram baseados na média (17 folículos) e no desvio padrão (12 folículos) do grupo no qual trabalhamos.

No presente trabalho, os valores para CFA em *Bos indicus* estão próximos aos utilizados por Santos et al. (2013), (baixa,  $\leq 10$ ; Intermediária, 11 a 24; alta  $\geq 25$ ), que ainda relataram uma maior taxa de prenhez em vacas com baixa CFA, contrariando os estudos anteriores sobre CFA realizados com vacas *Bos taurus*. Embora não tenhamos encontrado diferença estatística entre as classes de CFA, houve uma tendência ( $p = 0.09$ ) da baixa contagem em apontar índices superiores de prenhez

Trabalhando com novilhas Holandesas, Ireland et. al. (2007) obtiveram número maior de embriões produzidos a partir de ovários superestimulados em animais que apresentavam alta CFA. O mesmo autor encontrou relação positiva na produção de embriões a partir da fertilização *in vitro*, em vacas com alta contagem de folículos antrais ( $\geq 25$  folículos), quando comparadas com fêmeas de baixa CFA ( $\leq 15$  folículos), relacionando então uma maior fertilidade a indivíduos com alta CFA. Cinco anos depois, Mossa et.al. (2012) confirmou tal observação a partir de vacas Holandesas submetidas a programas de inseminação artificial com observação do cio.

Pesquisas recentes têm relacionado a alta CFA a qualidade oocitária e embrionária e a maiores taxas de prenhez em fêmeas taurinas (Ireland et al., 2008; Mossa et al., 2012; Silva-Santos et al., 2015). Uma possível explicação para os dados encontrados seria a existência de algumas distinções no ambiente hormonal da vaca. Em fêmeas taurinas, que apresentam baixa CFA, tem sido observada menor capacidade de síntese de progesterona ou inferior crescimento endometrial (Jimenez-Krassel et al., 2009), além de ovários menores (Ireland et al., 2008), diminuição da produção de progesterona e secreção aumentada de FSH (Evans et al, 2010, Ireland et al., 2011).

Na pesquisa de Martinez et al. (2013), foi relatada menor taxa de concepção à primeira IA (45, 0% vs 66,5;  $p < 0,02$ ) e menor taxa de partição (64,0 % vs 79,9%;  $p < 0,02$ ) em vacas Holandesa e Jersey, respectivamente, com baixa ( $< 20$  folículos) e alta ( $> 30$  folículos) CFA.

Entretanto, estudos realizados com *Bos indicus* e *Bos indicus-taurus* não confirmaram taxa de concepção mais elevada nos animais com CFA alta (Mendonça, et al., 2013; Santos, et al., 2014). Trabalhando com 595 vacas *Bos indicus*, Rodrigues, et al. (2013), adotaram valores superiores para CFA (baixa  $\leq 32$ , intermediária CFA entre 32 e 48 e alta CFA  $\geq 48$ ) em comparação aos utilizados por Burns et al., (2005) e

Ireland et. al. (2007). Os resultados obtidos não indicaram correlação das prenhez com CFA, assim como o nosso trabalho, embora tenhamos atribuído valores menores para as contagens de CFA.

Santos et al. (2013), adotando valores para de alta ( $\geq 25$  folículos), intermediária (11 a 24 folículos) e baixa ( $\leq 10$  folículos) CFA, também não encontraram diferença nas taxas de prenhez em vacas zebuínas (alta, 51,67%; intermediária 48,00% e baixa CFA, 60,50%). Contudo as vacas com baixa população de folículos antrais apresentaram maior taxa de concepção (60,5%) quando comparadas às vacas de intermediária (48,0%).

Uma hipótese plausível para justificar a discrepância entre populações foliculares pré- antrais de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*, seria a possibilidade de haver um maior pool da reserva ovariana em vacas zebuínas. No entanto, tal hipótese foi descartada por Silva-Santos et al., (2011) e Rosa et. al., (2013), que analisando ovários de *Bos indicus* e *Bos taurus* não encontraram maior reserva de folículos pré-antrais em ovários das fêmeas *Bos indicus*.

Esses estudos demonstram que pode existir uma grande diferença nos valores das CFA nas vacas *Bos taurus* (alta,  $\leq 15$ ; intermediária 16 a 24; alta,  $\geq 25$ , Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007) e *Bos indicus* (baixa  $\leq 32$ , intermediária CFA entre 32 e 48 e alta CFA  $\geq 48$ ), Rodrigues et. al., (2015), assim como o impacto da CFA sobre o taxa de fertilidade do rebanho.

Rodrigues et al. (2015), que tiveram valores médios de CFA ( $44,27 \pm 0,89$  folículos) mais elevados que o nosso ( $16,83 \pm 11,7$  folículos) relataram menores taxas de prenhez (32,77%), em comparação ao que encontramos (52,72%). Essas divergências podem estar relacionadas ao grupamento zootécnico avaliado (Sartori e Barros, 2011), assim como aos fatores inerentes dos gametas masculinos, que podem ter interferido nas taxas de concepção.

As vacas utilizadas em nosso trabalho eram recém-paridas e em sua maioria foram apresentadas á IATF antes dos 40 dias pós-parto. Segundo Starbuck-Clemmer et al. (2007), vacas paridas podem apresentar menor contagem do número de folículos em relação a novilhas, que pode explicar maior CFA em nosso trabalho comparado ao demais realizados em novilhas *Bos taurus*. Contrariamente, Burns et al. (2005), trabalhando com vacas holandesas, não atribuíram efeitos da categoria animal, estado fisiológico e ECC sobre a CFA, sugerindo que esta característica tem efeito individual.

O escore de condição corporal (ECC) exerceu influência na taxa de concepção em nosso trabalho. Na categoria de alta CFA, o ECC 2 a 2,5 apresentou taxa de concepção superior quando comparada ao ECC 3 a 3,5 (60,87% vs 38,03%) respectivamente. Assim como as vacas de ECC 3 a 3,5 apresentaram menor taxa de concepção nas categorias de intermediária e alta CFA quando comparada às demais, como ilustra a tabela 2.

Os nossos resultados indicam que pode haver uma somatória de fatores, pois há uma contradição entre os dados de Santos et., (2009) onde afirma que a taxa de concepção é afetada negativamente pelo baixo ECC.

Outro fator que pode ter contribuído para nossos resultados é que as vacas estavam, possivelmente, em ganho de peso após o parto devido às boas condições de manejo e pastagem.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se que vacas *Bos indicus* submetidas à IATF não sofreram influência da população de folículos antrais na taxa de concepção das vacas submetidas ao protocolo de IATF, indicando que a baixa CFA não é responsável por níveis inferiores de fertilidade do rebanho.

O que o ECC exerceu influência negativa na taxa de concepção da categoria de alta CFA.

## REFERÊNCIAS

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

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

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2014. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>>. Acesso em: 30/01/2016

BARREIROS, T. R. R., BLASCHI, W., SANTOS, G. M. G., MOROTTI, F., ANDRADE, E. R., BARUSELLI, P. S., e SENEDA, M. M. Dynamics of follicular growth and progesterone concentrations in cyclic and anestrous suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 651-656, 2014.

BARUSELLI, P. S., BATISTA, E. O. S., VIEIRA, L. M., e SOUZA, A. H. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 487-497, 2015.

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

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F. T.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BO, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.

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

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

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A., BARUSELLI, P. S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for

self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

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

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

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

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* X *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

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

CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal Animal Science**, v. 87, p. 1871-1980, 2009.

CUTAIA, L., TRÍBULO, R., MORENO, D., e BÓ, G. A. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v. 59, p. 216, 2003.

DE OLIVEIRA JUNIOR, J. S.; CARDOSO, C. J. T.; DA SILVA, W. A. L.; KISCHEL, H.; SOUZA, M. B.; ANDRADE, E. R., NOGUEIRA, E.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M.; MELO-STERZA, F. A. População de folículos antrais em vacas e novilhas da raça Nelore e Girolando. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 3741-3750, 2015.

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

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



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

EVANS, A. C. O.; MOSSA, F.; WALSH, S. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine off spring. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 31-37, 2012.

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

FARIA, C. U.; MAGNABOSCO, C. U.; ALBUQUERQUE, L. G.; REYES, A.; BEZERRA, L. A. F.; LOBO, R. B. Análise bayesiana na estimação de correlações genéticas entre escores visuais e características reprodutivas de bovinos Nelore utilizando modelos linear-limiar. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 949-958, 2009.

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

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

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

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

FORNI, S.; FEDERICI, J. F.; ALBUQUERQUE, L. G. Tendências genéticas para escores visuais de conformação, precocidade e musculatura à desmama de bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 572-577, 2007.

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

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

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

GOMES, R. G.; SARAPIÃO; F. D.; LINDQUIST, A. G.; UFALO, I.; BERGAMO, L.Z.; SENEDA, M. M. Novos conhecimentos de fisiologia de reprodução aplicados na bovinocultura. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, n. 6, 2014, Londrina. **Anais...Londrina: UEL**, p.41-46.

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

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

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

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

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

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

HEHENKAMP, W. J. K.; LOOMAN, C. W. N.; THEMMEN, A. P. N.; DE JONG, F. H.; TE VELDE, E. R.; BROEKMANS, F. J. M. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 91, p. 4057-4063, 2006.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2.ed. Belo Horizonte, p. 49, 1998.

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

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal de 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/html>>. Acesso em: 30/01/2016.

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

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

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

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1272-1281, 2009.

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

KUNKLE, W. E.; SAND, R. S.; ERA, D. O. Effect of body condition on productivity in beef cattle. In: FIELDS, M. J.; SANDS, R. S. (Ed.). **Factors affecting calf crop**. Boca Raton: CRC Press, p. 167-178, 1994.

LALMAN, D. L.; KEISLER, D. H.; WILLIAMS, J. E.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; MALLETT, D. M. Influence of postpartum weight and body condition change on

duration of anestrus by undernourished suckled beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2003-2008, 1997.

LIMA, J. M. P.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; BEZERRA, M. B. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 135-140, jul./set. 2014.

LUNARDELLI, P. A.; GONZÁLEZ, S. M.; MACHADO, F. Z.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Folículos Preantrales, Emergencia Folicular y Aplicaciones. **Spermova**, v. 3, p.130-133, 2013.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. **Circular Técnica, Embrapa Pecuária Sudeste**, n. 57, 2008.

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

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; REIS, E. L.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Produção embrionária de vacas Holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 227, 2005.

MARTINS, J. R. A.; TAKADA, L.; ABRAHÃO, R. G.; FREITAS, C. P.; CALEGARI, R. S. Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize *in vitro* bovine embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1194, 2007.

MENDONÇA, H. G. R.; SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS T. R. R.; BLASCHI, W.; MOROTTI, F.; MORAES, F. L. Z.; SENEDA, M. M. Pregnancy rates following FTAI of Nelore heifers (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 452, 2013.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p.179- 189, 2009.

MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 1-26, 2005.

MOROTTI, F.; BARREIROS, T. R. R.; MACHADO, F. Z.; GONZÁLEZ, S. M.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction**, v. 12, p. 479-486, Jul./Sept. 2015.

MOROTTI, F., CAMPOS, J.T., OLIVEIRA, E.R., SENEDA, M.M.,. Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone. *Semina: Ciências Agrárias* 34, 3865-3872. 2013b

MOROTTI, F., CAMPOS, J.T., SENEDA, M.M.,. Fixed-time artificial insemination using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. **Semina: Ciências Agrárias** 34, 3873-3882. 2013a

MOROTTI, F.; SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; MORITZ, Y.; MARCANTONIO, T. N.; SENEDA, M. M. Follicular dynamics in Nelore females (*Bos indicus*) with high or low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 352-352, 2014. Abstract.

MOSSA, F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. Low numbers of ovarian ollicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2355-2361, 2012.

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

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

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

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

PRYCE, J. E.; COFFEY, M. P.; SIMM, G. The relationship between body condition score and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p.1508-1515, 2001.

RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 300, 1976.

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

RICO, C.; DROUILHET, L.; SALVETTI, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZÉ, J-L.; PILLET, E.; PONSART, C.; FABRE, S.; MONNIAUX, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 932-944. 2012.

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

RODRIGUES, A. S.; OLIVEIRA, S. N.; FERRAZ, P. A.; LOIOLA, M. V. G.; COUTINHO, T. P.; SANTOS, M. M.; CHALHOULB, M. Antral follicle counts in Nelore females with different reproductive parameters and body condition score. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 395, 2013b.

RODRIGUES, A. S.; OLIVEIRA, S. N.; LOIOLA, M. V. G.; FERRAZ, P. A.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; DE LISBOA RIBEIRO FILHO, A. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. **Ciência Rural**, v. 45, p. 711-717, 2015 b.

RODRIGUES, A. S.; OLIVEIRA, S. N.; LOIOLA, M. V. G.; ANDRADE, B. H. D. A.; FERRAZ, P. A.; AYRES, M. C. C.; RIBEIRO FILHO, A. D. L. Fertility of Nelore females after a fixed-time artificial insemination according to antral follicle count. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 801-804, 2013 a.

ROSA, C. O., MARINHO, L. S. R., LUNARDELLI, P. A., MACHADO, F. Z., GONZALEZ, S. M., ROSA, P. R. A., **Cesaro M.P., Bueno J.V.R., Bordignon V.**, Seneda, M. M. In vitro embryo development and gene expression in granulosa and cumulus cells from *Bos indicus* cows with different numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 762-762, 2015.

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

RUBIN, K. C. P.; PONTES, J. H. F.; NONATO JR, I.; ERENO JR, J. C.; PANSARD, H.; SENEDA, M. M. Influence of Nelore blood on the in vivo production of oocytes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 183, 2005.

SANTOS, S. A.; ABREU, U. G. P.; SOUSA, G. S.; CATTO, J. B. Condição corporal, variação de peso e desempenho reprodutivo de vacas de cria em pastagem nativa do Pantanal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 354-360, 2009.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; MOROTTI, F.; SILVA, C. B.; MORAES, F. L. Z.; GIUDICISSI, D. P. L.; SENEDA, M. M. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 10, p.451. 2013.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal reproduction science**, v. 165, p. 17-21, 2016.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in nelore cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 206, 2014.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; SILOTO, L. S.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T. N.; MARINHO, L. S. R.; THASMO, R. L. O.; KOETZ, J. R. C.; CINTRA, D. M. L.; SENEDA, M. M. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa contagem de folículos antrais: resultados preliminares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p. 422, 2012.

SANTOS, S. A.; RENNÓ, F. P.; ALVES, N. G.; TORRES, C. A. A.; PEREIRA, J. C.; ARAÚJO, C. V. Condição corporal ao parto e produção de leite sobre o desempenho reprodutivo de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, p. 919-931, 2010.

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

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

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 905- 920, 2004.

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

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

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

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

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

SENEDA, M.M.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.; SCHNEIDER, C.L. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. In: 4º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, v.4, Londrina. 2010, **Anais... Londrina: SIRAA**, p.14-22,2010.

SILVA-SANTOS, K. C., MARINHO, L. S. R., SANTOS, G. M. G., MACHADO, F. Z., GONZALEZ, S. M., LISBOA, L. A., E SENEDA, M. M. . Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 180-186, 2013.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C. M.; SENEDA, M. M. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 228-232, 2014 a.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, 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.

SILVA-SANTOS, K. C.; SILOTO, L. S.; SANTOS, G. M. G.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T. N.; SENEDA, M. M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, p. 48-51, 2014 b.



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

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

SONOHATA, M. M.; OLIVEIRA, C. A. L.; CANUTO, N. G. D.; DANTAS, N. G.; ABREU, U. G. P.; FERNANDES, D. D. Escore de condição corporal e desempenho reprodutivo de vacas no Pantanal do Mato grosso do Sul – Brasil. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 988-998, 2009.

STARBUCK-CLEMMER, M. J.; HERNANDEZ-FONSECA, H.; AHMAD, N.; SEIDEL, G.; INSKEE, E. K. Association of fertility with numbers of antral follicles within a follicular wave during the oestrous cycle in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 337- 342, 2007.

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

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **IETS Embryo Transfer Newsletter**, v. 22, p. 12-9, 2004.

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

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

WALSH, S. W.; MOSSA, F.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. J. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, p. 4503-4511, 2014.

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

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