



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUSTAVO ROMERO GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DA IDADE E CONTAGEM DE FOLÍCULOS
ANTRAIS SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE
ÉGUAS DOADORAS**

Londrina
2018

GUSTAVO ROMERO GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DA IDADE E CONTAGEM DE FOLÍCULOS
ANTRAIS SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE
ÉGUAS DOADORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2018

GUSTAVO ROMERO GONÇALVES

**INFLUÊNCIA DA IDADE E CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS
SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS
DOADORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin Centro
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 02 de março de 2018.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram provenientes do órgão abaixo:

1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC

DEDICATÓRIA

A Deus.
A minha família.
Aos meus amigos e a todos os envolvidos na execução deste trabalho.

RESUMO

GONÇALVES, Gustavo Romero. **Influência da idade e contagem de folículos antrais ovarianos sobre características reprodutivas de éguas doadoras**. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Estudos apontam a influência da idade e da contagem de folículos antrais (CFA) sobre fatores relacionados à fertilidade de algumas espécies de animais, principalmente em relação às fêmeas bovinas. No entanto, no que diz respeito à espécie equina, as informações ainda são escassas, devido ao baixo número de pesquisas envolvendo o assunto neste modelo animal. Com o intuito de verificar a influência da idade e da CFA sobre outras características reprodutivas (diâmetro do folículo dominante; taxa de crescimento folicular; grau de edema uterino; número de embriões recuperados por meio da lavagem uterina), foram selecionadas 15 éguas doadoras da raça Quarto de Milha, com idade variando entre 3 e 17 anos. Os animais foram submetidos à avaliações a cada 48 horas através do método de ultrassonografia transretal por no mínimo três ciclos estrais completos. Os dados referentes ao diâmetro e taxa diária de crescimento folicular, número de folículos antrais, bem como as outras características reprodutivas foram obtidos ao longo do acompanhamento. Para análise dos dados, as éguas foram divididas em grupos de baixa ($n = 6; \leq 8$ folículos) e alta ($n = 9; \geq 9$ folículos) CFA, e em grupos de éguas consideradas jovens ($n = 11; \leq 9$ anos) e velhas ($n = 4; \geq 10$ anos). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de análise de variância pelo modelo linear geral, enquanto que os qualitativos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Os animais do grupo de alta CFA ($2,2 \pm 0,1$ mm/ dia) demonstraram diferença na taxa de crescimento folicular ($p = 0,037$) em comparação ao grupo de baixa CFA ($2,0 \pm 0,2$ mm/ dia). Houve tendência estatística quanto a taxa de crescimento folicular entre os grupos de animais jovens e velhos ($p = 0,097$), no qual os primeiros apresentaram uma taxa de crescimento folicular ($2,2 \pm 0,3$ mm/ dia) maior em relação aos mais velhos ($1,8 \pm 0,2$ mm/ dia). O grau de edema uterino se alterou durante alguns momentos da avaliação entre os animais dos grupos de baixa ou alta CFA, bem como neste último grupo, ainda, foi constatado um maior grau de edema uterino em determinado momento quando comparados aos animais com menor CFA. E ainda, a CFA foi maior em éguas consideradas jovens ($9,4 \pm 0,3$ folículos antrais) em comparação as mais velhas ($7,8 \pm 0,2$ folículos antrais). Além disso, não houve diferenças quanto ao diâmetro do folículo pré-ovulatório ($p = 0,974$) e nem na taxa de recuperação embrionária ($p = 0,154$) quando comparados aos grupos de idade e de CFA. Este estudo sugere que a idade exerce influência sobre a CFA, enquanto que a CFA atua sobre o grau de edema uterino, assim como ambos (idade e CFA) atuam sobre a taxa de crescimento folicular em éguas.

Palavras-chave: Colheita de embriões. Ovários. População folicular. Ultrassonografia. Folículo.

ABSTRACT

GONÇALVES, Gustavo Romero. **Influence of age and ovarian antral follicle count on reproductive characteristics of donor mares.** 2018. 49 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Studies point to the influence of age and antral follicle count (AFC) on factors related to the fertility of some animal species, especially in relation to bovine females. However, with regard to the equine species, the information is still scarce, due to the low number of research involving the subject in this animal model. In order to verify the influence of age and AFC on other reproductive traits (diameter of the dominant follicle, follicular growth rate, degree of uterine edema, number of embryos recovered through uterine lavage), 15 quarter horse donor mares were selected, ranging from 3 to 17 years old. The animals were evaluated every 48 hours by the transrectal ultrasonography during at least three complete estrus cycles. Data regarding the diameter and daily rate of follicular growth, number of antral follicles, as well as other reproductive traits were obtained throughout the evaluations. For data analysis, mares were divided into low ($n = 6, \leq 8$ follicles) or high ($n = 9; \geq 9$ follicles) AFC groups, and in groups of mares considered young ($n = 11, \leq 9$ years) or old ($n = 4, \geq 10$ years). The quantitative data were submitted to the analysis of variance by the general linear model, while the qualitative data were submitted to the Mann-Whitney test, and the differences were considered significant if $p < 0.05$. The animals in the high AFC group (2.2 ± 0.1 mm/ day) showed a difference in follicular growth rate ($p = 0.037$) compared to the low AFC group (2.0 ± 0.2 mm/ day). There was a statistical tendency regarding follicular growth rate between the groups of young and old animals ($p = 0.097$), in which the former had a higher follicular growth rate (2.2 ± 0.3 mm/ day) than the older ones (1.8 ± 0.2 mm/ day). The uterine edema was altered during some moments of the evaluation between the animals of the groups with low or high CFA, as well as this latter group, presented an increased uterine edema at a certain moment, when compared with lower CFA group. Still, AFC was higher in young mares (9.4 ± 0.3 antral follicles) compared to older ones (7.8 ± 0.2 antral follicles). In addition, there were no differences in preovulatory follicle diameter ($p = 0.974$) or embryo recovery rate ($p = 0.154$) when compared to age and AFC. This study suggests that age exerts influence on AFC, while AFC acts on the degree of uterine edema, as both (age and AFC) act on the follicular growth rate in mares.

Keywords: Embryo collection. Ovaries. Follicular population. Ultrasonography. Follicle.

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Esquema representativo das alterações celulares que ocorrem durante as fases do desenvolvimento folicular | 17 |
| Figura 2 – Desenvolvimento folicular do estágio primordial até pré-ovulatório..... | 19 |
| Figura 1 – Diferença no número de folículos antrais ovarianos em éguas com baixa contagem folicular ou alta contagem folicular..... | 39 |
| Figura 2 – Taxa de crescimento folicular entre os grupos de éguas com idade igual ou inferior a 9 anos e éguas com idade igual ou superior a 10 anos ($p = 0,097$) | 41 |
| Figura 3 – Taxa de crescimento folicular (mm/ dia) das éguas de baixa ou alta contagem de folículos antrais de éguas ($p < 0,037$)..... | 41 |
| Figura 4 – Média de idade de éguas com baixa ou alta contagem de folículos antrais ($p = 0,001$) | 43 |
| Figura 5 – Grau de edema uterino de éguas com baixa (linha pontilhada) ou alta CFA (linha contínua) durante o controle folicular de éguas doadoras de embrião..... | 44 |
| Quadro 1 – Perfil do diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm), grau de edema uterino e produção embrionária de doadoras Quarto de Milha (N = 15), dos grupos de animais jovens (≤ 9 anos) <i>versus</i> velhas (≥ 10 anos) e com baixa (≤ 7 folículos) ou alta (≥ 8 folículos) contagem de folículos antrais (CFA) | 45 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 | OVÁRIOS | 13 |
| 2.2 | OOGÊNESE | 13 |
| 2.3 | FOLICULOGÊNESE | 15 |
| 2.4 | FOLÍCULO OVARIANO | 16 |
| 2.4.1 | FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS | 16 |
| 2.4.2 | FOLÍCULOS ANTRAIS | 18 |
| 2.5 | INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS | 19 |
| 2.6 | COLHEITA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS | 21 |
| 2.7 | INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS SOBRE ASPECTOS REPRODUTIVOS | 22 |
| 3. | HIPÓTESE | 31 |
| 4. | OBJETIVOS | 32 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL | 32 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| 5. | ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO | 33 |
| 1. | INTRODUÇÃO | 36 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| | REFERÊNCIAS | 47 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES | 49 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil concentra o maior rebanho de equinos da América Latina que, somado aos muares e asininos, proporcionam movimentação financeira de R\$ 7,3 bilhões por ano. São 5.500.000 de animais que compõem a tropa, nos diferentes meios onde estão inseridos. A popularização desta espécie adequou-se a novas vertentes de sua utilização, pois além das funções usuais conhecidas como o transporte de cargas e trabalhos relacionados ao campo, os equinos também são destinados a inúmeras modalidades esportivas. Além disso, mais recentemente, observa-se a inclusão destes animais no auxílio fisioterapêutico para reabilitação de portadores de necessidades especiais (Brasil, 2015; 2016).

Junto ao crescimento do rebanho de equídeos, a procura pela melhoria genética destes animais também aumentou, intensificando assim, a busca de conhecimento científico quanto ao progresso da eficácia reprodutiva das fêmeas. As éguas apresentam menor eficiência reprodutiva que as fêmeas bovinas, o que pode estar relacionado com a negligência no momento da seleção dos reprodutores para os cruzamentos (Ley, 2004; Tezza, 2015).

O estudo da CFA é amplamente difundido na espécie bovina, sendo assim, as pesquisas realizadas utilizam a contagem de folículos antrais (CFA) ovariana com o intuito de obter uma correlação prática e simples sobre a população folicular ovariana e a fertilidade (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008; Hansen et al., 2011; Nagai et al., 2016; Ghanem et al., 2016).

Existe um interesse crescente em trabalhos relativos à CFA e sua influência sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas, bem como suas aplicações em biotécnicas reprodutivas. Trabalhos recentes indicam que o conhecimento sobre a CFA e fatores relacionados podem ser de extrema importância para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas (Ireland et al., 2011; Pontes et al., 2011; Silva-Santos et al., 2014a, b; Nagai et al., 2016).

1 É notório que a CFA é uma característica altamente variável entre as fêmeas bovinas,
2 mas com elevada repetibilidade no mesmo indivíduo, independente do dia do ciclo estral, da
3 idade, da raça, do estágio de lactação ou da época do ano (Burns et al., 2005; Ireland et al.,
4 2007; Mossa et al., 2010; Silva-Santos et al., 2014a).

5 Algumas pesquisas feitas com a espécie bovina evidenciam a CFA como um
6 biomarcador fenotípico associado positivamente com a função ovariana (Ireland et al., 2009;
7 Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2012), tamanho do ovário, número de folículos e
8 oócitos morfológicamente saudáveis nos ovários (Ireland et al., 2008), a capacidade de
9 resposta a superovulação, o número de embriões transferíveis, produção *in vitro* de
10 blastocistos, fertilidade (Cushman et al., 2009; Mossa et al., 2012; Silva-Santos et al. 2014^a;
11 Nagai et al., 2016), peso ao nascer (Cushman et al., 2009), alterações na concentração do
12 hormônio anti-mulleriano (AMH), testosterona, hormônio folículo estimulante (FSH) e
13 progesterona, podendo esta estar associada a altas taxas de mortalidade embrionária em
14 bovinos com menor CFA (Inskeep, 2004; Jimenez-Krassel et al., 2009; Batista et al., 2014;
15 Jimenez-Krassel et al., 2015; Ghanem et al., 2016; Loureiro et al., 2016; Stojšin-Carter et al.,
16 2016), e, por fim, informações sobre a longevidade do rebanho (Jimenez-Krassel et al., 2015).

17 Atualmente, pesquisadores se dedicam à investigação de parâmetros reprodutivos que
18 possam refletir na escolha de éguas com fertilidade satisfatória ou até mesmo maior (Claes et
19 al., 2015; 2016; 2017). Recentemente, os primeiros trabalhos realizados neste modelo animal
20 por pesquisadores (Claes et al., 2015; 2016; 2017; Scarlet et al., 2017), apontaram uma
21 relação direta entre a CFA com a idade, concentração plasmática de AMH e qualidade dos
22 folículos antrais ovarianos. Porém, o número de pesquisas feitas até o momento é baixo, estas
23 devem considerar o estudo de uma maior população de éguas para a CFA, a fim de
24 estabelecer um parâmetro quanto ao agrupamento de éguas com alta e baixa população
25 folicular. E ainda, estudar as diferenças que há de acordo com a idade, raça, escore de

1 condição corporal, morfologia ovariana e do folículo pré-ovulatório, bem como com a
2 produção embrionária entre os grupos, para que seja possível um maior esclarecimento sobre
3 a influência da contagem folicular sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo de éguas.

4 Considerando um melhor conhecimento a cerca deste assunto, o objetivo deste estudo
5 foi realizar a CFA na espécie equina por meio do método de ultrassonografia (US) transretal,
6 a fim de estabelecer grupos de baixa e alta população; avaliar a influência da idade e da CFA
7 de éguas sobre os seguintes parâmetros reprodutivos: taxa diária de crescimento folicular;
8 diâmetro do folículo pré-ovulatório; grau de edema uterino e produção de embriões.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIOS

Os ovários têm uma função exócrina, para a produção do oócito ou gameta feminino, e um sistema endócrino, cuja função é a produção de hormônios sexuais da fêmea. O seu formato e tamanho varia conforme a espécie animal e a fase do ciclo estral. Em equinos, os ovários têm o formato de feijão, devido à presença da fossa ovulatória e uma incisura na borda unida do ovário (Blanchard et al., 2003; Hafez; Hafez, 2004).

A superfície do ovário é coberta por um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, chamado epitélio germinativo; logo abaixo, há a túnica albugínea, composta por tecido conjuntivo denso. O ovário é composto pelas porções cortical e medular. Na primeira, observa-se a presença de corpos lúteos e os folículos ovarianos que contêm os oócitos, os quais se apresentam em diferentes estágios de desenvolvimento ou atrésicos (Hafez; Hafez, 2004). Estes são encontrados na região cortical, a qual é chamada de região funcional do ovário (Blanchard et al., 2003). A região medular contém tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (Junqueira; Carneiro, 2008). Sua função consiste na sustentação e nutrição do ovário. Nas éguas, estas porções se encontram na região mais interna e externa do ovário, respectivamente (Blanchard et al., 2003; McGeady, 2006).

2.2 OOGÊNESE

Ao longo de toda a vida reprodutiva de uma fêmea, a funcionalidade do ovário é influenciada pela interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, que, juntos, atuam no processo de desenvolvimento folicular e oocitário, conhecidos como foliculogênese

1 e oogênese, respectivamente (Figueiredo et al., 2008). Este, por sua vez, consiste na formação
2 e modificação das células germinativas primordiais (CGP) até alcançar o estágio de formação
3 do oócito haplóide fecundado (Rüsse, 1983). Isto ocorre ainda durante a vida fetal, juntamente
4 com a foliculogênese e, apenas alguns dos oócitos presentes no *pool* de reserva conseguirão
5 atingir o processo de desenvolvimento até a fecundação (Bessa; Dode, 2013).

6 De acordo com Van Den Hurk; Zhao (2000), o processo de formação de oócitos inclui
7 sete etapas: a geração de CGP; a migração de CGP para as gônadas; a colonização das
8 gônadas por CGP; a diferenciação de CGP em oogônias; a proliferação de oogônias; o início
9 da meiose e a parada na fase diplóteno da prófase I da meiose. Cerca de três semanas após a
10 fertilização, as CGP surgem e migram do epitélio do saco vitelino, através do tecido
11 conjuntivo do intestino posterior, para a crista genital. Durante o seu trajeto, as CGP
12 multiplicam-se rapidamente e, por volta de sete semanas de gestação, as células derivadas do
13 mesonefro e do epitélio celomático migram para dentro da crista genital, formando cordões
14 medulares primitivos e cordões sexuais, respectivamente. Os cordões primitivos são
15 colonizados por CGP e, nos fetos do sexo feminino, são chamados de oogônias (Smitz;
16 Cortvrindt, 2002; Van Den Hurk; Zhao, 2000).

17 Após as múltiplas divisões mitóticas das células germinativas primordiais, originam-se
18 dois tipos diferentes de células. A primeira linhagem celular forma-se a partir das sucessivas
19 divisões mitóticas, dando origem a uma linha de células chamadas de oogônias. Enquanto que
20 a segunda permanece em intérfase para divisões periódicas, que darão origem às novas células
21 germinativas, as quais posteriormente se diferenciarão em oócitos (Hirshfield, 1991). Na
22 espécie equina, o início da divisão mitótica das oogônias ocorre por volta dos setenta dias de
23 gestação, e é finalizado em torno dos cinquenta dias após o nascimento (McGeady, 2006).

24 Como continuação do processo de oogênese, ocorre a interrupção das células que se
25 encontram em estágio da primeira divisão meiótica e a constituição de oócitos primários, que

1 persistem neste estágio até a puberdade (Hirshfield, 1991). Quando a fêmea atinge a
2 puberdade, em razão da liberação do hormônio luteinizante (LH), a meiose é retomada poucas
3 horas antes da ovulação, e o núcleo oocitário entra em diacinese, iniciando-se o processo de
4 ruptura da vesícula germinativa, seguido das fases de metáfase I, anáfase I e telófase I,
5 ocorrendo a expulsão do primeiro corpúsculo polar e formando então o oócito secundário,
6 com o núcleo na segunda divisão meiótica. Esta fase é rápida, passando pela prófase II e
7 metáfase II, onde ocorre a segunda parada da meiose. O oócito somente retomará a meiose
8 caso seja fecundado. Uma vez fecundado pelo espermatozoide, passará para anáfase II e
9 telófase II, seguido da expulsão do segundo corpúsculo polar e da formação do oócito
10 haploide fecundado, finalizando a oogênese (Figueiredo et al., 2008).

11

12 **2.3 FOLICULOGÊNESE**

13

14 O crescimento folicular representa uma série de modificações celulares e moleculares
15 de maneira sequencial, do oócito, das células foliculares e da teca (Hafez e Hafez, 2004;
16 Rajkovic et al., 2006).

17 O período da foliculogênese compreende o processo de formação, crescimento e
18 maturação do folículo primordial até o estágio de folículo pré-ovulatório. Os folículos
19 primordiais que estão em repouso na prófase I da meiose saem da fase de latência e começam
20 a se desenvolver, passando pelas fases intermediárias e entrando na fase pré-antral. Folículos
21 quiescentes são frequentemente mobilizados para a fase de crescimento de maneira contínua
22 durante os anos reprodutivos da fêmea, até o esgotamento da reserva, na senescência
23 (Baerwald, 2003; Hafez e Hafez, 2004).

24 A partir da maturidade sexual, os folículos ovarianos podem seguir dois caminhos:
25 ovulação ou atresia. A grande maioria dos folículos não chega à ovulação e acabam passando

1 pelo processo de atresia folicular (Hulshof et al., 1994). Mesmo com os inúmeros estudos e o
2 desenvolvimento de diversas técnicas reprodutivas nas diferentes espécies, as informações
3 existentes sobre o processo de foliculogênese, os mecanismos de proliferação, maturação e a
4 atresia folicular ainda são pouco compreendidos.

5

6 **2.4 FOLÍCULO OVARIANO**

7

8 O folículo ovariano é a unidade estrutural e funcional do ovário e desempenha duas
9 funções principais: uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides) e a outra
10 exócrina ou gametogênica. Esta é essencial para manutenção, crescimento e maturação de
11 oócitos primários ou imaturos, culminando com a liberação de um oócito maturo na ovulação.
12 Os folículos localizam-se no córtex ovariano, sendo classificados em folículos pré-antrais
13 (não cavitários) e folículos antrais ou cavitários (Figueiredo et al., 2008). Os folículos
14 ovarianos pré-antrais são classificados em primordiais, primários e secundários, de acordo
15 com o estágio de desenvolvimento; e os folículos antrais compreendem os folículos terciários
16 e pré-ovulatórios ou de Graaf (Figueiredo et al., 2008; Lima-Verde et al., 2011).

17 A composição do folículo ovariano consiste num oócito circundado por células
18 somáticas (granulosa e tecais). Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada,
19 visto que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e se
20 diferenciam (Bristol-gould, Woodruff 1997; Hafez e Hafez, 2004; Lima-Verde et al., 2011).

21

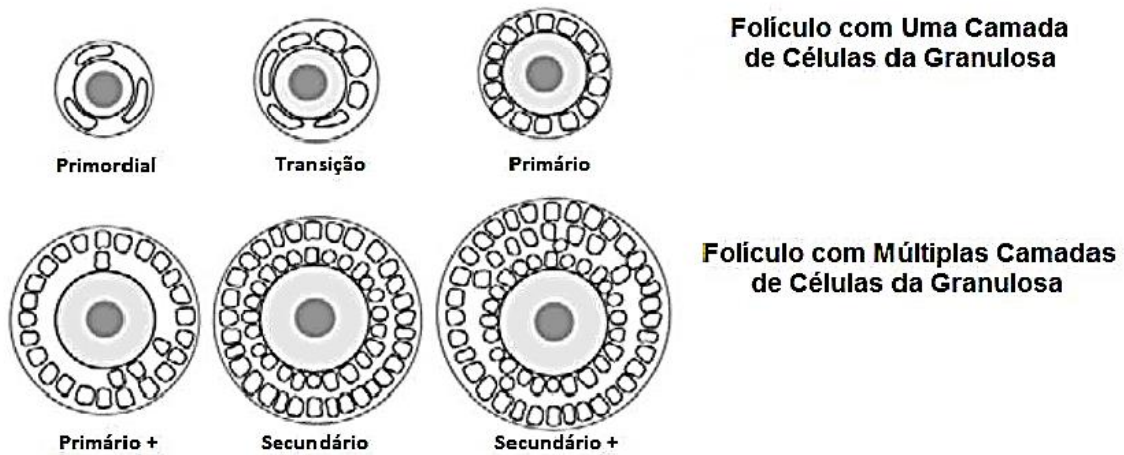
22 **2.4.1 FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS**

23

24 Os folículos pré-antrais constituem a grande maioria dos folículos ovarianos, e são
25 classificados de acordo com o formato, tamanho e o número de camadas das células da

1 granulosa que envolve o oócito imaturo, em primordiais, primários e secundários, assim como
 2 mostra a figura 1 (Bessa; Dode, 2013).

3
 4 **Figura 1.** Esquema representativo das alterações celulares que ocorrem durante as fases do
 desenvolvimento folicular.



5
 6 Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008).

7

8 Os folículos primordiais constituem 90% de toda a população folicular presente no
 9 ovário (Figueiredo et al., 2008) e consistem no estágio inicial do desenvolvimento folicular;
 10 são denominados de *pool* de reserva. Nos folículos primordiais, as células germinativas são
 11 achatadas e estão em contato com o oócito. As células da granulosa são envolvidas por uma
 12 lâmina basal e seus núcleos são achatados. As células dos folículos primordiais possuem
 13 formato fino com extensões citoplasmáticas delgadas (Da Silva-Buttkus et al., 2008). Durante
 14 esta fase alguns folículos são ativados e iniciam o processo de crescimento e diferenciação.
 15 Cada folículo primordial é composto por um oócito envolto por uma camada de quatro a oito
 16 células da granulosa de formato pavimentoso (Hulshof et al., 1994).

17 Na formação dos folículos primários, a atividade proliferativa das células da granulosa
 18 culmina na formação de uma camada de células cubóides ao redor do oócito. Com o
 19 crescimento dos folículos, as células germinativas passam para o formato cuboide, com o
 20 núcleo mais próximo da lâmina basal. Nesta fase, os folículos intermediários possuem um

1 oócito circundado tanto por células germinativas com formato pavimentoso quanto por células
2 cuboides (Da Silva-Buttkus et al., 2008). Desse modo, os folículos primários apresentam um
3 oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa em formato cuboide. Os
4 folículos primordiais e primários não podem ser diferenciados através das medidas de
5 diâmetro, mas apenas pelas alterações morfológicas (Hulshof et al., 1994).

6 O aparecimento dos folículos secundários ocorre com o surgimento da segunda
7 camada das células da granulosa. A formação da zona pelúcida começa a partir do início do
8 crescimento dos folículos primordiais, sendo claramente visualizada em folículos secundários
9 (Figueiredo et al., 2008). Quando estes se encontram em estádios mais avançados, observa-se
10 o aparecimento das células da teca. Esta camada de células começa a se formar nos folículos
11 em crescimento em torno da membrana basal, e, então, se diferencia em teca interna e teca
12 externa (Rajkovic et al., 2006).

13

14 2.4.2 FOLÍCULOS ANTRAIIS

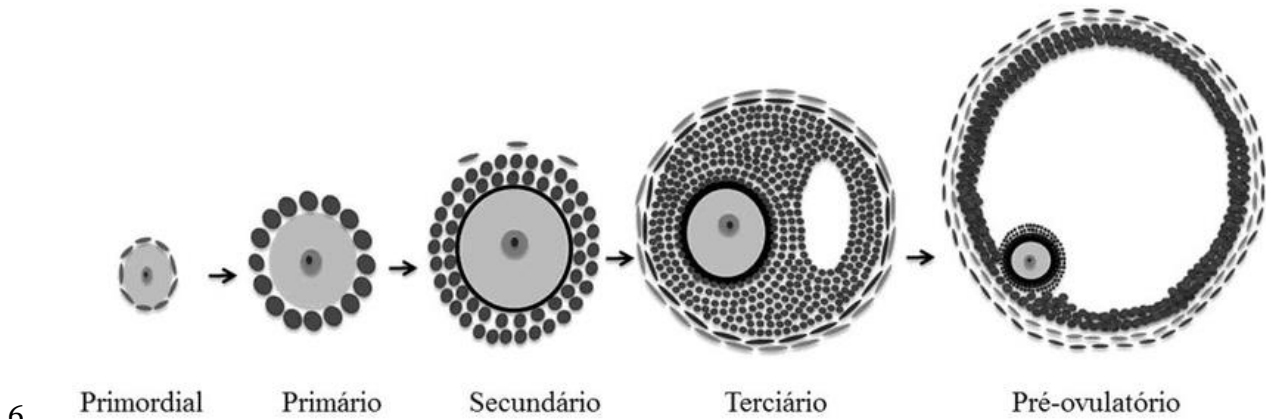
15

16 Os folículos que compõem a categoria dos folículos antrais são os terciários e de
17 Graaf, também denominados como maduros ou pré ovulatórios. A principal característica dos
18 folículos antrais é o aparecimento do antro folicular (Barnett et al., 2006; Figura 2).

19 Durante a formação dos folículos antrais, a relação entre a proliferação de células
20 germinativas e o crescimento do oócito muda conforme o desenvolvimento das camadas
21 destas células. Com o início da formação das múltiplas camadas, observa-se o
22 desenvolvimento de duas novas populações de células germinativas, uma em contato com o
23 oócito e a outra, em contato com a lâmina basal. Posteriormente, as camadas mais internas
24 não terão contato com nenhuma delas. Essas células internas, que perderam contato com a
25 lâmina basal se dividem mais frequentemente, devido a perdas de contato físico e de

1 sinalização de restrições impostas pelo contato com essa matriz extracelular. Após o
 2 desenvolvimento da segunda camada de células germinativas, a grande maioria das células
 3 apresentam mitoses orientadas perpendicularmente à lâmina basal (Da Silva-Buttkus et al.,
 4 2008).

5 **Figura 2.** Desenvolvimento folicular do estágio primordial até pré-ovulatório.



7 Fonte: Adaptado de Rocha et al. (2011).

8 Com a atividade proliferativa intensa das células da granulosa, ocorre o surgimento de
 9 uma área preenchida por líquido folicular, conhecida como antro folicular (Figueiredo et al.,
 10 2008; Bessa; Dode, 2013). Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado
 11 pela zona pelúcida, uma pequena cavidade antral e várias camadas de células tecais. Já os
 12 folículos de Graaf representam o estágio final do desenvolvimento folicular (Gordon, 1994).

13

14 2.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS

15

16 Com o advento das biotecnologias relacionadas à reprodução, a inseminação artificial
 17 (IA) surgiu como forma de melhorar a qualidade genética e a eficiência reprodutiva dentro de
 18 um sistema de criação de cavalos (Weiss; Vianna; Muradás, 2003). Para tanto, é necessário
 19 que sejam considerados alguns procedimentos que são realizados previamente à inseminação
 20 artificial e que podem influenciar na taxa de prenhez, os quais consistem no método, na

1 análise e forma de estocagem do sêmen coletado, além disso, na avaliação da égua que será
2 inseminada e também a técnica que será utilizada (Watson, 1995).

3 A inseminação artificial é definida como o processo de deposição do sêmen no trato
4 reprodutivo da fêmea, por meio da manipulação artificial, tendo como objetivo à fertilização
5 do oócito (Bochio, 2006).

6 O ciclo estral da égua dura cerca de 21 dias, apresentando uma fase estrogênica (cio)
7 de cerca de 7 dias, e a ovulação ocorrendo por volta de 24 a 48 horas antes do seu término
8 (Hafez, 2004). Para a identificação do cio, do momento da I.A. e da ovulação, o
9 acompanhamento pode ser feito com a rufiação da égua, via palpação transretal e/ou com o
10 auxílio da ultrassonografia transretal (Shepherd, 2004).

11 Hoje em dia, recorre-se ao uso de hormônios para um melhor controle e sucesso da
12 técnica. O uso do hCG, ou então, da deslorelina, os quais são hormônios indutores da
13 ovulação em éguas, fornecem maior exatidão do tempo esperado para a inseminação e para a
14 ovulação. Tais hormônios são aplicados quando o diâmetro folicular atinge 35 mm, e espera-
15 se que a ovulação ocorra entre 36 a 48 horas após o uso (Watson, 1995; Shepherd, 2004;
16 Faria, 2010; Conboy, 2011; Melo et al., 2012).

17 A técnica de inseminação artificial com sêmen a fresco diluído é realizada com a égua
18 colocada em um tronco de contenção adequado, com a cauda enfaixada para uma melhor
19 visualização e higienização do períneo e da vulva. Antes disso, deve ser feita a retirada das
20 fezes do reto para evitar a contaminação durante o procedimento. O períneo e a vulva são
21 higienizados com solução de iodopovidona degermante ou sabão neutro por três vezes, após
22 isso, é feita a lavagem com água e posterior secagem da região com o uso de papel toalha. O
23 inseminador deve segurar a pipeta de inseminação com a mão enluvada com luva de palpação
24 estéril e lubrificada, protegendo a extremidade da pipeta com os dedos, para que na hora de
25 introduzi-la não lesione a mucosa vaginal. A mão é inserida na vagina da égua até a entrada

1 da cérvix, local pelo qual parte da pipeta será introduzida. E então, a seringa estéril contendo
2 o sêmen é acoplada à pipeta e o mesmo é depositado totalmente no corpo do útero. Antes de
3 remover a pipeta, a seringa é desacoplada e preenchida com ar, acoplada novamente e este ar
4 é depositado dentro da pipeta para que o sêmen remanescente saia dali e vá para o útero. Feito
5 isso, a mão e a pipeta vazia são retirados da vagina, com muito cuidado para não haver a
6 entrada de ar no local (Watson, 1995; Davies Morel, 2003; Shepherd, 2004; Brinsko et al.,
7 2011; Conboy, 2011).

8 Após 24 a 48 horas da I.A., um novo US transretal é realizado, a fim de se observar a
9 ovulação na égua, caso contrário, será necessária uma nova inseminação, devido ao tempo de
10 permanência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (Shepherd, 2004; Brinsko et
11 al., 2011).

12

13 **2.6 COLHEITA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS**

14

15 A colheita e transferência embrionária em equinos consiste em uma biotécnica
16 simples, por meio da qual, o embrião é retirado do interior do útero de uma égua doadora, e
17 em seguida, transferido para o útero de uma égua receptora por meio da manipulação artificial
18 (Hartman, 2011; Gomes et al., 2016).

19 Como vantagens, o procedimento permite a obtenção de um maior número de potros
20 nascidos de uma mesma égua; colheita de embriões de éguas velhas, sem riscos relacionados
21 à gestação das mesmas; colheita de embriões de éguas que estão em competição bem como
22 daquelas incapazes de gestar por problemas reprodutivos (Hartman, 2011; Gomes et a., 2016).

23 A colheita dos embriões é realizada cerca de 7 a 9 dias após a IA, através do método
24 não cirúrgico, por meio da passagem da sonda pela via transvaginal, assim como descrito
25 primeiramente por Oguri e Tsunami (1972). Após a passagem da mesma através da cérvix, o

1 cuff é inflado com ar, de forma a evitar que haja o refluxo do conteúdo intrauterino para o
2 meio externo. O útero é lavado de três a quatro vezes no máximo, com solução de ringer com
3 lactato de preferência, ou então, soro fetal bovino (Hartman, 2011; Gomes et al. 2016).

4 Após a lavagem uterina e colheita do embrião, o mesmo é lavado por 10 vezes no
5 meio de manutenção, e sem seguida, transferido para a égua receptora (Fleury et al., 2001). O
6 procedimento é feito a partir da passagem da pipeta de transferência através da cérvix, e
7 deposição do embrião no interior do corpo uterino (Hartman, 2011; Gomes et al., 2016).

8 O sucesso desta biotécnica depende tanto de fatores relacionados à fêmea, como
9 daqueles relacionados ao ambiente, para tanto, é necessário conhecimento e domínio sobre o
10 uso da técnica e o momento certo de aplicá-la (Fleury et al., 2001).

11

12 **2.7 INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS SOBRE ASPECTOS** 13 **REPRODUTIVOS**

14

15 Pouco se sabe sobre o efeito da contagem de folículos antrais ovarianos, bem como a
16 influência da idade sobre os diversos parâmetros reprodutivos na espécie equina. Atualmente,
17 as pesquisas são baseadas em estudos realizados em outras espécies, tais como ratas,
18 mulheres, ovelhas, e particularmente, em vacas, nas quais há um melhor conhecimento sobre
19 o assunto.

20 Através de alguns estudos feitos com estas espécies até então, pode se constatar a
21 influência de diversos fatores, tais como, a espécie, raça, genética, os níveis hormonais, o
22 *status* reprodutivo e a idade da fêmea, sobre a população de folículos antrais ovarianos
23 (Erickson et al., 1976; Roy, 1993; Cahill et al., 1979; Burns et al., 2005; Ghanem et al., 2016;
24 Loureiro et al., 2016; Stojisin-Carter et al., 2016).

1 Em vacas, observa-se a influência da CFA sobre alguns aspectos reprodutivos. Vacas
2 com baixa CFA possuem características relacionadas à baixa fertilidade, como os ovários
3 pequenos (Ireland et al., 2008), menor taxa de prenhez na inseminação artificial (Mossa et al.,
4 2012), menor responsividade à superovulação (Ireland et al., 2007), reduzida espessura
5 endometrial e concentração de progesterona (Jimenez-Krassel et al., 2009), e maior
6 quantidade de marcadores de células do *cumulus* associado à baixa qualidade do oócito
7 (Ireland et al., 2009; Kussano et al., 2016). Além disso, a população de folículos antrais
8 (PFA) possui grande variabilidade individual, mas a contagem de folículos antrais (CFA)
9 possui alta repetibilidade no mesmo indivíduo, independente do dia do ciclo estral, da idade,
10 da raça, do estágio de lactação ou da época do ano (Ireland et al., 2007, 2008; Jimenez-
11 Krassel et al., 2009; Silva-Santos et al., 2014c). A raça ou subespécie pode exercer grande
12 influência na CFA (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Stojsin-Carter et al., 2016). Ainda,
13 a baixa CFA associada com a redução da fertilidade também já foi relatada em seres humanos
14 (Baerwald et al., 2003).

15 Jimenez-Krassel et al. (2015) demonstraram que uma única determinação da
16 concentração de AMH em novilhas leiteiras (Holandesas) pode ser um método diagnóstico
17 simples para prever a longevidade do rebanho. O AMH pode ser um marcador fenotípico útil
18 e está relacionado positivamente com a CFA. Este último dado também foi investigado por
19 Claes et al. (2016), em seu trabalho com a espécie equina, no qual os níveis plasmáticos de
20 AMH tiveram uma correlação direta com a CFA e também com a idade dos animais.

21 De acordo com o trabalho feito por Claes et al. (2015) com fêmeas da espécie equina,
22 a CFA pode ser feita a partir da visualização de folículos com ≥ 2 mm de diâmetro em ambos
23 os ovários. O ultrassom pode ser utilizado de forma segura durante a avaliação das ondas
24 foliculares para identificar a população folicular antral (Burns et al., 2005; Silva-Santos et al.,
25 2014c).

1 Até o momento, há apenas três trabalhos realizados pelo mesmo grupo de
2 pesquisadores, sobre este assunto voltado à espécie equina. Em um dos estudos, Claes et al.
3 (2017) demonstraram a idade exerce certo grau de influência sobre características
4 reprodutivas do ciclo estral de éguas, tais como, um aumento do intervalo entre ovulações em
5 éguas consideradas velhas (> 18 anos), alteração na concentração hormonal, bem como a
6 tendência de um menor diâmetro dos folículos pré-ovulatório destas fêmeas em comparação
7 às mais jovens (9 – 18 anos). Além deste, outro trabalho conduzido pelo mesmo grupo (2015)
8 revela a repetibilidade da CFA entre os ciclos estrais de éguas, e a correlação entre a CFA
9 junto à concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano (AMH) em fêmeas de meia
10 idade (9 - 18 anos) e idosas (> 19 anos). Ademais, sabe-se que éguas mais velhas possuem
11 mais problemas quanto à condição uterina, no que diz respeito ao processo de senilidade que
12 tal órgão sofre com o passar o tempo, e também na qualidade dos oócitos e uma maior taxa de
13 perdas embrionárias (Ball et al., 1986; Carnevale; Ginther, 1992; Carnevale et al., 1999).

14 Desse modo, não se pode supor que há respostas consolidadas e influência direta da
15 CFA e da idade em diversos parâmetros reprodutivos na espécie equina, pois os dados
16 presentes na literatura são escassos e inconclusivos. Por isso se faz necessário a realização de
17 mais estudos, a fim de verificar a influência destas variáveis sobre fatores ligados à fertilidade
18 destes animais.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 REFERÊNCIAS

2
3 BAERWALD A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON R.A. Characterization of ovarian follicular
4 wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v.69, n.3, p.1023–1031, 2003.

5
6 BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; HILLMAN, R.B.; WOODS, G.L. Pregnancy rates at days 2 and
7 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares.
8 **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 611-9, 1986.

9
10 BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A.
11 Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.12,
12 n.15, p.537-555, 2006.

13
14 BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.;
15 DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S.
16 Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos
17 indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**,
18 v.49, n.43, p.448-452, 2014.

19
20 BESSA, I.R.; DODE, M.A.N. Ovocênese e modificações epigenéticas. **Revista Brasileira de**
21 **Reprodução Animal**, v.37, n.3, p.241–248, 2013.

22
23 BOCHIO, L.F.M. **Inseminação artificial em equinos**. 2006. Disponível em:
24 <[http://portalabqm.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=766:inseminaca](http://portalabqm.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=766:inseminacao-artificial-em-equeinos&catid=75:artigos&Itemid=30)
25 [o-artificial-em-equeinos&catid=75:artigos&Itemid=30](http://portalabqm.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=766:inseminacao-artificial-em-equeinos&catid=75:artigos&Itemid=30)>. Acesso em: 04 de Novembro de
26 2014.

27
28 BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.;
29 RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. 2ª ed. St. Louis: Mosby, 2003. 352 p.

30
31 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Equideos**. Disponível em:
32 <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 14 outubro 2015.

33
34 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Revisão do estudo do**
35 **agronegócio do cavalo**. 2016. Brasília. Disponível em:
36 <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
37 [setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
38 [cavalo](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)>. Acesso em: 01 dezembro 2017.

39
40 BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.;
41 HINRICHS, K.; HARTMAN, D. Semen Collection and Artificial Insemination with Fresh
42 Semen. In: **Manual of Equine Reproduction**. 3ª ed. St. Louis, MO: Mosby, p. 176-206,
43 2011.

44
45 BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*).
46 **Theriogenology**, v.66, n.1, p.5–13, 2006.

47
48 BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J.
49 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation
50 among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum

- 1 follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62,
2 2005.
- 3
- 4 CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high
5 and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, n.1, p. 27-36, 1979.
- 6
- 7 CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and
8 reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 1101-15, 1992.
- 9
- 10 CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHMITT, S.J.; GATES,
11 H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy.
12 **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 299, 1999.
- 13
- 14 CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J.J.;
15 CONLEY, A.J.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The interrelationship between
16 anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. **Equine veterinary**
17 **journal**, v. 47, n. 5, p. 537-541, 2015.
- 18
- 19 CLAES, A.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H.T; CURRY, T.E.; SQUIRES, E.L.;
20 SCOGGIN, K.E. Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral
21 follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. **Equine veterinary journal**, v. 48,
22 n. 6, p. 741-748, 2016.
- 23
- 24 CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ROSER, J.F.; WOODWARD, E.M.; DAVOLLI,
25 G.M.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The influence of age, antral follicle count and
26 diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares. **Theriogenology**, v. 97, p. 34-
27 40, 2017.
- 28
- 29 CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.;
30 FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef
31 cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal**
32 **Animal Science**, v.87, n.6, p.1971-1980, 2009.
- 33
- 34 CONBOY, H.S. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon, A.O.;
35 Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley- Blackwell,
36 2011. P. 1198-1207.
- 37
- 38 DA SILVA-BUTTKUS, P. et al. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell
39 proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the
40 ovary. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 23, p. 3890-3900, 2008.
- 41
- 42 DAVIES MOREL, M.C.G. Artificial Insemination. In:_____. **Equine Reproductive**
43 **Physiology, Breeding and Stud management**. 2^a ed. Aberystwyth, UK: Cabi Publishing, p.
44 295-309, 2003.
- 45
- 46 ERICKSON, B.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and
47 reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v. 15, n.4, p. 555-60,
48 1976.
- 49

- 1 EVANS, A.C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.;
2 IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of Maternal Environment During
3 Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring.
4 **Reproduction in Domestic Animal**, v.47, n.s4, p.31–37, 2012.
5
- 6 FLEURY, J.J., PINTO, A.J., MARQUES, A., LIMA, C.G., ARRUDA, R.P. Fatores que
7 afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em
8 equinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal
9 Science**. v. 38, n.1, p. 29-33, 2001.
10
- 11 GHANEM, N. et al. The Anti-Müllerian Hormone Profile is Linked with the In Vitro Embryo
12 Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy
13 Outcome. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 301-310, 2016.
14
- 15 GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1ª ed. **Cambridge: CAB
16 International: Raven Press**, 1994.
17
- 18 HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole, 2004. 501 p.
19
- 20 HANSEN, K.R.; HODNETT, G.M.; KNOWLTON, N.; CRAIG, L.B. Correlation of ovarian
21 reserve tests with histologically determined primordial follicle number. **Fertility and
22 Sterility**, v. 95, n. 1, p. 170-175, 2011.
23
24
- 25 HARTMAN, D.L. Embryo transfer. In: McKinnon, A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner,
26 D.D. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley- Blackwell, 2011. P. 2871-2879.
27
- 28 HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International
29 Review of Cytology**, v.124, p.43–101, 1991.
30
- 31 HULSHOF, S.C. J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN
32 HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries.
33 **Veterinary Quarterly**, v.16, n.2, p.78-80, 1994.
34
- 35 INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of
36 concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal Animal Science**,
37 v.82, n.s13, p.E24–E39, 2004.
38
- 39 IRELAND, J. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZA, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGERA, J.
40 K.; IRELAND, J. L. H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Does size matter in
41 females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian
42 function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and
43 causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and
44 Development**, v.23, n.1, p.1–14, 2011.
45
- 46 IRELAND, J. J.; ZIELAK, A.E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA,
47 A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH, G.W.; LONERGAN,
48 P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular
49 oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality
50 in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, n.5, p.954–964, 2009.

- 1 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
2 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND,
3 J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
4 follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, n.6, p.1219–1225,
5 2008.
- 6
- 7 IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.;
8 LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
9 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
10 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, n.6, p.1687–
11 1695, 2007.
- 12
- 13 IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD,
14 F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral
15 follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in
16 ovaries of young adult cattle. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.
- 17
- 18 JIMENEZ-KRASSEL, F., D. M. SCHEETZ , L. NEUDER, J. L. H. IRELAND, J. R..
19 PURSLEY, G. W. SMITH, R. J. TEMPELMAN, T. FERRIS, W. E. ROUDEBUSH, F.
20 MOSSA, P. LONERGAN , A. C. O. EVANS, AND J. J. IRELAND. Concentration of anti-
21 müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal**
22 **of Dairy Science**. V. 98, n.5, p 3036–3045, 2015.
- 23
- 24 JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.;
25 DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high
26 variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus
27 luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. **Biology of**
28 **Reproduction**, v.80, n.6, p.1272–1281, 2009.
- 29
- 30 KUSSANO, N. R. et al. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus
31 cells. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1167-1176, 2016.
- 32
- 33 LEY, WILLIAM B. **Reprodução em éguas: Para veterinários de equinos**. São Paulo:
34 Editora Roca Ltda, 2004. p. 220.
- 35
- 36 LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios
37 esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p. 472–
38 482, 2011.
- 39
- 40 LOUREIRO, B. et al. Expression of androgen-producing enzyme genes and testosterone
41 concentration in Angus and Nellore heifers with high and low ovarian follicle
42 count. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 523-527, 2016.
- 43
- 44 MCGEADY, T.A.; QUINN, P.J.; FITZPATRICK, E.S.; RYAN, M.T. Male and Female
45 Reproductive Systems. In: **Veterinary Embryology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., p.
46 245-251, 2006.
- 47
- 48 MELO, C.M.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ARAÚJO, G.H.; DELL'AQUA, J.R.,
49 J.A.; ALVARENGA, M.A. Eficiência do Acetato de Deslorelina e do Extrato de Pituitária

- 1 Equina na Indução da Ovulação em Éguas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, SP, v. 19, n.
2 3, p. 392-398, Set. 2012.
- 3
- 4 GOMES, R.G.; DA SILVA, B.C.; GONZÁLEZ, S.M.; LINDQUIST, A.G.; BLASCHI, W.;
5 BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M. Equine Reproduction: Physiology and Advances in
6 Technology. In: Seneda, M.M.; Silva-santos, K.C.; Marinho, L.R. **Biotechnology of Animal**
7 **Reproduction**. Hauppauge, New York: Nova Science Publisher's. p. 47 – 78, 2016.
- 8
- 9 MOSSA F.; WALSH, S.W.; LER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
10 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
11 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
12 n.5, p. 2355–2361, 2012.
- 13
- 14 NAGAI, K. et al. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and
15 developmental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral
16 follicles. **Biomedical Research**, v. 37, n. 1, p. 63-71, 2016.
- 17
- 18 OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Nonsurgical remating of equine eggs, and an attempt at
19 nonsurgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 187-
20 195, 1972.
- 21
- 22 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
23 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
24 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
25 donors. **Theriogenology**, v.75, n.9, p. 1640–1646, 2011.
- 26
- 27 RAJKOVIC, A.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. Follicular development: mouse, sheep,
28 and human models. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**, v. 1, p. 383-423, 2006.
- 29
- 30 ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles.
31 **Fertility and Sterility**, v.59, n.4, p.x 783-90, 1993.
- 32
- 33 RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Anatomical Bibliography**, v. 24, p.77–92, 1983.
- 34
- 35 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**,
36 v.1822, n.12, p.1896–1912, 2012.
- 37
- 38 SCARLET, D. et al. 120 Antral Follicle Count Of 2-Year-Old Mares Is Highly Correlated
39 With Anti-Müllerian Hormone Concentrations At 24 To 28 Weeks Of Age. **Reproduction,**
40 **Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 168-169, 2017.
- 41
- 42 SHEPHERD, C. Artificial insemination in mares. **In Practice**. v. 26, n. 3, p. 140-145, 2004.
- 43
- 44 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
45 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
46 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In
47 Vivo – of *Bos indicus-aurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
48 **Domestic Animal**, v.49, n.2, p.228–232, 2014a.
- 49

- 1 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; SANTOS, J.T.; OLIVEIRA,
2 E.R.; MACHADO, F.Z.; ROSA, C.O; SENEDA, M.M. The correlation between the number
3 of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos*
4 *taurus* cows. **Animal Reproduction Science** v.151, N.3-4, p.119–125. 2014b.
- 5
6 SILVA-SANTOS K.C.; SILOTO, L. S.; SANTOS, G. M. G.; MOROTTI, F.;
7 MARCANTONIO T. N.; SENEDA, M. M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian
8 Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low
9 Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animal**. v.49, n.1, p.48–51, 2014c.
- 10
11 SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro.
12 **Reproduction**, v.123, n.2, p.185–202, 2002.
- 13
14 STOJSIN-CARTER, A. et al. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences
15 in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Animal reproduction**
16 **science**, v. 167, p. 51-58, 2016.
- 17
18 TEZZA, L.B.L.; DITTRICH, J.R. **Reprodução em Equinos**. Disponível em:
19 <<http://www.gege.agrarias.ufpr.br/Portugues/equideo/arquivos/reproducao.pdf>>. Acesso em:
20 14 outubro 2015.
- 21
22 VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine
23 immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction**
24 **Update**, v.6, n.5, p.457-474, 2000.
- 25
26 WATSON, E. Artificial Insemination in Horses. **In practice**. v. 17, p. 54-58, Feb. 1995.
- 27
28 WEISS, R.R.; VIANNA, B.C.; MURADÁS, P.R. Inseminação Artificial em Éguas com
29 Sêmen “*In natura*” e Diluído. **Archives of Veterinary Science**. v. 8, 2003.
- 30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

3. HIPÓTESE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

- Animais jovens e aqueles que apresentam maior contagem de folículos antrais ovarianos (CFA) apresentam um melhor desempenho reprodutivo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a influência da idade, bem como da contagem de folículos antrais ovarianos (CFA) sobre os parâmetros reprodutivos de éguas doadoras da raça Quarto de Milha.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CFA de éguas por meio da ultrassonografia transretal, a fim de estabelecer grupos de baixa ou alta população folicular.
- Verificar se a idade e a CFA influenciam a taxa de crescimento folicular.
- Comparar o diâmetro do folículo pré-ovulatório com a idade e CFA das éguas.
- Averiguar a influência da idade, bem como da CFA sobre o grau de edema uterino.
- Comparar a taxa de recuperação embrionária entre os grupos de idade e também de CFA estabelecidos.
- Comparar a quantidade de folículos antrais entre os ovários direito e esquerdo.
- Observar se a idade exerce influência sobre a CFA das éguas.

**INFLUÊNCIA DA IDADE E CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS
SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS
DOADORAS**

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,
Brasil

RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência da idade e da contagem de folículos antrais (CFA) ovarianos sobre características reprodutivas da espécie equina, tais como: diâmetro do folículo dominante; taxa de crescimento folicular; grau de edema uterino e número de embriões coletados, foram selecionadas 15 éguas doadoras, com idade variando entre 3 – 17 anos, da raça Quarto de Milha, assistidas em programas de transferência de embriões. Os animais foram submetidos à avaliações a cada 48 horas, através do método de ultrassonografia transretal para coleta das informações, por no mínimo três ciclos estrais completos. Para a análise estatística, as éguas foram divididas em grupos de baixa ($n = 6; \leq 8$ folículos) ou alta ($n = 9; \geq 9$ folículos) CFA, e em grupos de éguas consideradas jovens ($n = 4; \leq 9$ anos) ou velhas ($n = 11; \geq 10$ anos). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de análise de variância pelo modelo linear geral, enquanto que os qualitativos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Os animais do grupo de alta CFA ($2,2 \pm 0,1$ mm/ dia) demonstraram diferença na taxa de crescimento folicular ($p = 0,037$) em comparação ao grupo de baixa CFA ($2,0 \pm 0,2$ mm/ dia). Houve tendência estatística quanto a taxa diária de crescimento folicular entre os grupos de animais jovens e velhos ($p = 0,097$), no qual os primeiros apresentaram uma taxa de crescimento folicular ($2,2 \pm 0,3$ mm/ dia) maior em relação aos mais velhos ($1,8 \pm 0,2$ mm/

1 dia). O grau de edema uterino se alterou durante alguns momentos da avaliação entre os
2 animais dos grupos de baixa ou alta CFA, bem como neste último grupo, ainda, foi constatado
3 um maior grau de edema uterino em determinado momento quando comparados aos animais
4 com menor CFA. E ainda, a CFA foi maior ($p = 0,001$) em éguas consideradas jovens ($9,4 \pm$
5 $0,3$ folículos antrais) em comparação as mais velhas ($7,8 \pm 0,2$ folículos antrais). Além disso,
6 não houve diferenças quanto ao diâmetro do folículo pré-ovulatório ($p = 0,974$) e nem sobre a
7 taxa de recuperação embrionária ($p = 0,154$) no que diz respeito à idade e CFA dos animais.
8 Sendo assim, o presente estudo sugere que a idade e a CFA atuam na taxa de crescimento
9 folicular, assim como a CFA sobre o grau de edema uterino, e que há diferença na CFA de
10 acordo com a idade das éguas. Além de observar também que as demais variáveis analisadas
11 não sofrem influência da idade e da CFA na espécie equina.

12
13 **Palavras-chaves:** colheita de embriões, ovários, população folicular, ultrassonografia,
14 folículo.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 **Abstract**

2
3 In order to verify the influence of age and antral follicle count (AFC) on reproductive
4 characteristics of the equine species, such as: diameter of the dominant follicle; follicular
5 growth rate; degree of uterine edema and number of embryos collected, 15 Quarter Horse
6 donor mares were selected, ranging from 3 to 17 years old, assisted in embryo transfer
7 programs. The animals were evaluated every 48 hours by the transrectal ultrasonography for
8 data collection, during at least three complete cycles. For data analysis, mares were divided
9 into low ($n = 6, \leq 8$ follicles) or high ($n = 9, \geq 9$ follicles) AFC groups, and in groups of mares
10 considered young ($n = 4, \leq 9$ years) or old ($n = 11, \geq 10$ years). The quantitative data were
11 submitted to the analysis of variance by the general linear model, while the qualitative data
12 were submitted to the Mann-Whitney test, and the differences were considered significant if p
13 < 0.05 . The animals in the high AFC group (2.2 ± 0.1 mm/ day) showed a difference in
14 follicular growth rate ($p = 0.037$) compared to the low AFC group (2.0 ± 0.2 mm/ day). There
15 was a statistical tendency regarding the daily rate of follicular growth between the groups of
16 young and old animals ($p = 0.097$), in which the former had a higher follicular growth rate
17 (2.2 ± 0.3 mm/ day) than (1.8 ± 0.2 mm/ day). The uterine edema was altered during some
18 moments of the evaluation between the animals of the groups with low or high CFA, as well
19 as this latter group, presented an increased uterine edema at a certain moment, when
20 compared with lower CFA group. Also, AFC was higher ($p = 0.001$) in young mares ($9.4 \pm$
21 0.3 antral follicles) compared to older ones (7.8 ± 0.2 antral follicles). In addition, there were
22 no differences in preovulatory follicle diameter ($p = 0.974$) or embryo recovery rate ($p =$
23 0.154) with respect to age and AFC of the animals. Thus, the present study suggests that age
24 and AFC act on the follicular growth rate, as well as AFC on the uterine edema, and that there
25 is difference in AFC according to the age of the mares. It was also observed that the other
26 reproductive traits were not influenced by age and AFC in mares.

1 **Keywords:** embryo collection, ovaries, follicular population, ultrasonography, follicle.

2

3 **1. INTRODUÇÃO**

4

5 Existe grande variabilidade na população de folículos antrais ovarianos entre os
6 indivíduos; entretanto, na contagem de folículos antrais (CFA) há uma alta repetibilidade no
7 que diz respeito à espécie bovina (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008; Mossa et al.,
8 2010; Silva-Santos et al., 2014). Já foi relatado para fêmeas desta espécie a influência da CFA
9 e idade sobre alguns aspectos reprodutivos, dentre os quais diminuição da CFA em animais
10 mais velhos (Cushman et al., 2009). Tais fatores atuam em conjunto sobre a dinâmica de
11 crescimento folicular; a concentração plasmática de alguns hormônios; a baixa qualidade
12 oocitária; a menor resposta destes animais a protocolos hormonais; e conseqüentemente, a
13 baixa produção embrionária (Cushman et al., 2009; Ireland et al., 2007; 2011; Mossa et al.,
14 2012; Silva-Santos et al., 2014; Stojšin-Carter et al., 2016). No entanto, tais resultados a
15 respeito do assunto na espécie equina ainda não são encontrados.

16 Diversas causas podem ter efeito sobre a fertilidade de éguas, como por exemplo, a
17 idade. Recentemente, foi demonstrada influência da idade sobre os níveis plasmáticos de
18 alguns hormônios, tais como o hormônio antimülleriano (AMH) e a progesterona, bem como
19 sobre a dinâmica de crescimento folicular e CFA em éguas de idade mais avançada (Claes et
20 al., 2015; 2016; 2017; Scarlet et al., 2017). Além destes, outros impactos negativos que esta
21 variável pode desempenhar sobre a atividade reprodutiva foram observados por Ginther et al.
22 (2008; 2009), relacionados à atividade folicular e a hormonal diminuídas, assim como
23 folículos pré-ovulatórios menores em éguas com idade mais avançada. Porém, até o presente
24 momento, as informações relacionadas ao assunto nesta espécie de modelo animal ainda são
25 escassas e inconclusivas.

1 Portanto, são necessários mais estudos a fim de analisar a influência da idade e da
2 CFA sobre os aspectos reprodutivos envolvendo a fertilidade das éguas. Sendo assim, o
3 presente estudo teve como objetivo investigar se tais fatores possuem ligação com o
4 desempenho reprodutivo destes animais a partir da comparação com o diâmetro do folículo
5 dominante, a taxa diária de crescimento folicular, o grau de edema uterino e a produção
6 embrionária em éguas doadoras da raça Quarto de Milha.

7

8 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

9

10 *2.1 Animais*

11

12 Para este estudo, foram utilizadas éguas doadoras (n = 15) da raça Quarto de Milha,
13 com idade entre 3 e 17 anos, durante a estação reprodutiva (Outubro a Janeiro). As fêmeas
14 são provenientes da região de Maringá – PR (Latitude: -23.4273, Longitude: -51.9375 23° 25'
15 38" Sul, 51° 56' 15" Oeste), e fazem parte de um programa de colheita e transferência de
16 embriões. A utilização das mesmas para a execução do experimento foi autorizada pelo
17 comitê de ética para o uso de animais (CEUA - UEL) sob o processo de nº 9841.2016 – 52.
18 Todos os animais permaneceram saudáveis e em ótimo estado nutricional durante todo o
19 período do experimento.

20

21 *2.2 Contagem de folículos antrais*

22

23 A quantificação da contagem de folículos antrais foi realizada por meio do exame de
24 ultrassonografia transretal, no qual todos os folículos ≤ 2 mm foram contados, considerando o
25 par de ovários para a estimativa. Cada ovário foi avaliado minuciosamente, de forma seriada,
26 de um bordo ao outro, com o intuito de possibilitar a avaliação de todo o órgão, bem como
27 não haver a repetição da contagem de um mesmo folículo, semelhante ao descrito por Claes et

1 al. (2016). Para tanto, as fêmeas eram contidas em tronco de contenção adaptado para a
2 espécie e o exame era realizado apenas por um avaliador experiente para possibilitar a
3 padronização das avaliações.

4 Foram acompanhados pelo menos três ciclos estrais de cada animal, de modo que a
5 ultrassonografia transretal fosse realizada em dias alternados, a cada 48 horas, a partir do
6 momento da ovulação (D0) até a ovulação seguinte. Todos os dados coletados foram anotados
7 em planilhas de controle para acompanhamento.

8

9 *2.3 Avaliação ultrassonográfica do útero e folículo*

10

11 Para a avaliação ultrassonográfica do útero, as imagens foram pausadas na região de
12 transição entre o corpo e cornos uterinos, e o grau de edema uterino classificado numa escala
13 de 0 a 4 (McCue; Scoggin; Lindholm, 2011). Sendo que, o aumento no grau de edema uterino
14 apenas era observado a partir do momento que fosse constatada dominância folicular. O
15 diâmetro do folículo dominante foi obtido pela média da distância entre as margens superior e
16 inferior e a distância entre os bordos laterais do mesmo. Após isto, valores obtidos foram
17 avaliados quanto a CFA e idade de cada grupo experimental.

18

19 *2.4 Inseminação artificial e colheita de embriões*

20

21 Durante todo o acompanhamento de crescimento folicular, as éguas foram submetidas
22 ao procedimento de inseminação artificial (IA) ao final de cada ciclo estral. Assim que era
23 identificado um folículo de diâmetro ≥ 35 mm, administrava-se pela via intramuscular 3 ml
24 (750 μ g) do indutor de ovulação (Sincrorrelin®, Cravinhos, SP., Brasil), e, então, após 24
25 horas da indução, estas fêmeas eram submetidas ao procedimento de IA com o uso de sêmen
26 refrigerado. A colheita de embriões foi realizada entre os dias 7 e 9 pós IA, por meio da

1 lavagem uterina pelo método transcervical. Foi administrado 1 litro de ringer com lactato (JP
2 Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP., Brasil) por vez, através da sonda para
3 colheta de embrião equino (CH 32, Minitube®), totalizando no máximo 3 lavagens. Caso não
4 fosse visualizado o embrião durante os 3 ciclos completos de lavagens, retirava-se o conteúdo
5 e a sonda, e então, o processo era finalizado. As anotações a respeito do sucesso ou não na
6 obtenção de embriões coletados das éguas em cada ciclo eram feitas em planilhas de controle.
7 Após isto, foi realizada a análise do efeito da idade e da CFA sobre o sucesso ou não na
8 obtenção de embriões em cada ciclo.

9

10 2.5 Grupos experimentais

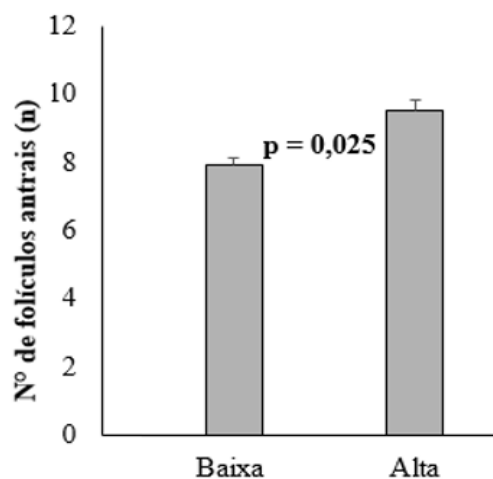
11

12 As éguas foram divididas em grupos de animais considerados jovens ($n = 11; \leq 9$
13 anos) *versus* velhas ($n = 4; \geq 10$ anos) de acordo com a idade. Este dado foi obtido a partir do
14 registro dos animais fornecidos pelo proprietário. Para a separação dos grupos em relação à
15 CFA, as éguas foram divididos em grupos de baixa ($7,8 \pm 0,2$ folículos antrais) ou alta CFA
16 ($9,4 \pm 0,3$ folículos antrais), assim como mostra a figura 1 ($p = 0,025$).

17

18 **Figura 1.** Diferença no número de folículos antrais ovarianos em éguas com baixa contagem

19 folicular ou alta contagem folicular.



20

1 2.6 *Análise estatística*

2

3 Para a comparação entre as diferentes idades, diferentes contagens de folículos antrais
4 bem como suas interações, os dados numéricos foram analisados por ANOVA, empregando o
5 modelo linear geral. O edema uterino, por se tratar de um dado qualitativo ordinal, foi
6 avaliado pelo teste Mann-Whitney. O valor considerado quando observado tendência
7 estatística foi quando $p < 0,06$ e $\leq 0,10$. Para análise descritiva, os dados paramétricos, estão
8 apresentados como média \pm erro padrão ($M \pm SE$) e dos dados não paramétricos como
9 mediana. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®
10 16.1.1. O nível de significância para rejeitar H_0 (hipótese nula) foi de 5%, portanto, um nível
11 de significância $\leq 0,05$ foi considerado para indicar um efeito das variáveis e suas interações.

12

13 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

14

15 Houve tendência estatística entre os grupos na avaliação da influência da idade sobre a
16 taxa de crescimento folicular por dia ($p = 0,097$). Éguas jovens, com idade média de $5,3 \pm 0,1$
17 anos, apresentaram uma maior taxa de crescimento ($2,2 \pm 0,3$ mm/ dia) em comparação às
18 éguas consideradas velhas, com idade média de $13,9 \pm 0,5$ anos, as quais tiveram uma taxa de
19 crescimento de $1,8 \pm 0,2$ milímetros por dia (Figura 2).

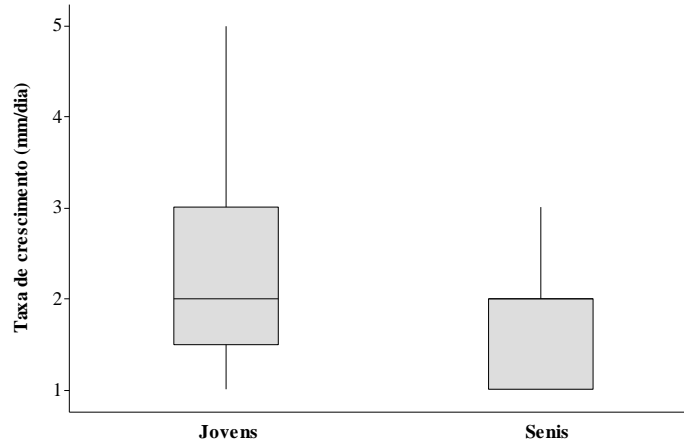
20 Quando comparada à taxa de crescimento folicular entre os grupos de alta ou baixa
21 CFA, a diferença observada foi de $p = 0,037$, em que éguas de alta CFA apresentaram maior
22 taxa de crescimento ($2,2 \pm 0,1$ mm/ dia) comparado as de baixa CFA ($2,0 \pm 0,2$ mm/ dia;
23 figura 3).

24

25

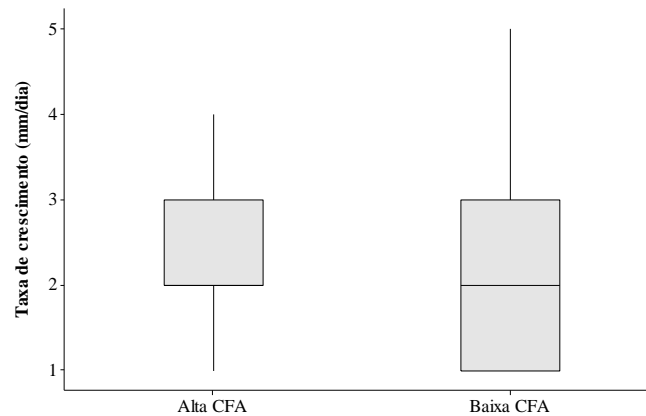
26

- 1 **Figura 2.** Taxa de crescimento folicular entre os grupos de éguas com idade igual ou inferior
2 a 9 anos e éguas com idade igual ou superior a 10 anos ($p = 0,097$).



- 3
4

- 5 **Figura 3.** Taxa de crescimento folicular (mm/ dia) das éguas de baixa ou alta contagem de
6 foliculos antrais de éguas ($p < 0,037$).



- 7
8

- 9 Este é o primeiro trabalho a relatar a influência que a CFA exerce sobre a taxa de
10 crescimento folicular em éguas. Em relação à variável idade, Ginther et al. (2008), também
11 constataram uma menor taxa de crescimento folicular em éguas mestiças da raça pônei. O
12 estudo revelou uma menor taxa de crescimento folicular em éguas consideradas velhas (≥ 18
13 anos; $2,8 \pm 0,2$ mm/ dia), em comparação aos demais grupos de animais jovens (5 – 6 anos;

1 3,5 ± 0,2 mm/ dia) e de meia idade (10 – 14 anos; 3,5 ± 0,2 mm/ dia). Porém, tal diferença
2 somente foi observada em éguas a partir de 18 anos de idade, o que não condiz com o
3 presente trabalho, no qual os animais pertencem a outro grupo racial e demonstraram
4 diferença a partir dos 10 anos. O fato de haver um retardo quanto ao crescimento folicular
5 nestes animais, pode estar relacionado com as alterações que ocorrem nas concentrações
6 hormonais e na CFA com o avanço da idade das éguas (Claes et al., 2016; 2017). Além disso,
7 Claes et al. (2017) em outro trabalho, também relata que há um aumento do intervalo entre
8 ovulações em éguas consideradas velhas e com menor CFA.

9 Desta forma, levando em consideração a idade e a CFA, bem como os aspectos
10 relacionados, pode-se pressupor que sejam fatores relevantes a ser considerados em
11 programas reprodutivos. O uso de hormônios no momento errado e o acompanhamento
12 folicular destes animais podem interferir diretamente no sucesso das biotécnicas reprodutivas,
13 podendo ser esta uma justificativa para as falhas encontradas quando se trata de animais com
14 idade mais avançada.

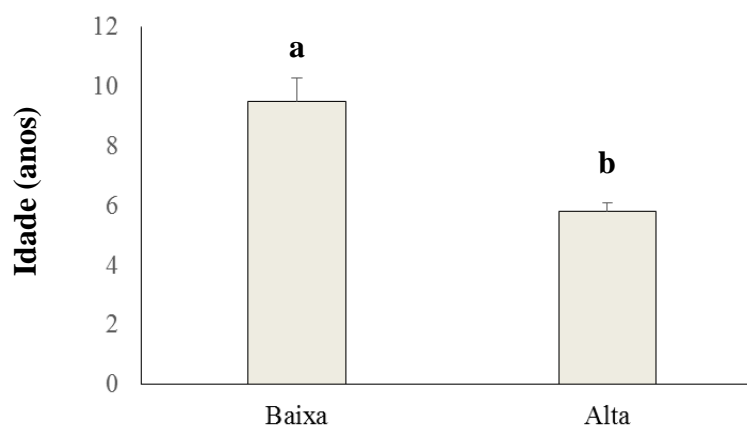
15 Tendo em vista a interação entre os dois fatores: idade e CFA, as éguas do grupo de
16 baixa CFA apresentaram uma média de idade superior (9,5 ± 0,8 anos) quando comparadas ao
17 grupo de alta CFA (p = 0,001), como demonstra a figura 4.

18 A diferença encontrada entre a CFA dos grupos está de acordo com o relatado por
19 Claes et al. (2016), no qual o grupo de éguas consideradas jovens (3 – 8 anos) também
20 apresentou uma CFA maior em comparação ao grupo de éguas velhas (19 – 27 anos). Porém,
21 neste mesmo trabalho, um outro grupo de éguas consideradas de meia idade (9 - 18 anos), não
22 apresentou diferença na CFA quando comparado com as éguas jovens. Os grupos de idade
23 considerados nesta pesquisa e no presente trabalho, são diferentes. No presente estudo, foi
24 encontrada diferença na CFA em éguas a partir dos 10 anos de idade. Acredita-se que a

1 ambientação, a alimentação, o clima bem como o fator racial, são questões que possam ter
2 ligação com tais achados.

3

4 **Figura 4.** Média de idade de éguas com baixa ou alta contagem de folículos antrais ($p =$
5 0,001).



6

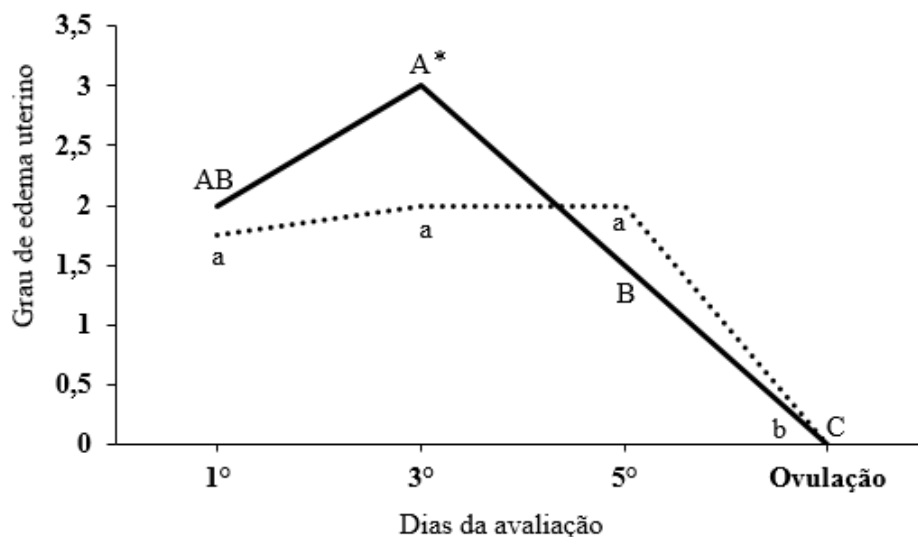
7

8 Quanto ao grau de edema uterino, foi observada diferença apenas entre os animais
9 pertencentes aos grupos de baixa ou alta CFA e não em relação à idade. Nota-se que houve
10 alterações do grau de edema uterino entre os momentos de avaliação dentro de cada grupo.
11 Enquanto que, na comparação desta variável entre os grupos de alta ou baixa CFA, foi
12 observada diferença apenas no 3º dia de avaliação, assim como mostra a figura 5.

13

14 Os resultados apresentados em relação a diferença encontrada quanto ao grau de
15 edema uterino de acordo com a CFA de éguas são inéditos. Carnevale et al. (1992), por sua
16 vez, demonstraram em seu trabalho, que há tendência ($p = 0,13$) em relação a um aumento no
17 grau de edema uterino com o passar da idade das éguas avaliadas. Entretanto, a referida
18 pesquisa foi realizada com aparelho mais antigo, o que também interfere diretamente na
19 qualidade das imagens, e ainda, o número de éguas contidas no grupo de animais
20 considerados velhos ($n = 22$) era consideravelmente superior ao do grupo de éguas jovens ($n =$
9).

1 **Figura 5.** Grau de edema uterino de éguas com baixa (linha pontilhada) ou alta CFA (linha
 2 contínua) durante o controle folicular de éguas doadoras de embrião.



3
 4 Momentos de avaliação seguidos de letras maiúsculas (A,B,C) e letras minúsculas (a,b) significa
 5 diferença estatística dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

6 * significa diferença estatística ($p < 0,05$) para o edema uterino entre os grupos de baixa ou alta CFA.

7

8 Não houve diferença quanto à influência da idade e da CFA sobre o diâmetro do
 9 folículo pré-ovulatório ($p = 0,219$; $p = 0,758$, respectivamente), corroborando com os
 10 achados de Claes et al. (2017) com éguas sem raça definida e de diferentes grupos de idade
 11 (jovens: 3 – 8 anos; meia idade: 9 – 18 anos e velhas: 19 – 27 anos; Quadro 1).

12 No que se refere à taxa de sucesso durante a colheita dos embriões, o presente estudo
 13 não revela diferença de acordo com a idade e CFA dos animais ($p = 0,290$; $p = 0,474$,
 14 respectivamente). Não há relatos na literatura sobre estes dados na espécie em questão,
 15 todavia, Ireland et al. (2007) e Silva-santos et al. (2014), em seus estudos com animais da
 16 espécie bovina, demonstram uma maior taxa de recuperação embrionária em animais com
 17 alta CFA ($10,6 \pm 2,7$; $6,95 \pm 5,34$ embriões, respectivamente) em comparação ao grupo de
 18 baixa CFA ($4,7 \pm 0,7$; $1,9 \pm 2,13$ embriões, respectivamente). Já na presente pesquisa, o

1 número de animais utilizados e a espécie são fatores que devem ser levados em consideração,
 2 uma vez que as pesquisas envolvendo a espécie bovina estão à frente e a quantidade de
 3 animais utilizada é superior. Além disso, nota-se também uma média de recuperação
 4 embrionária significativamente maior em relação à trabalhos realizados com a espécie
 5 equina.

6

7 **Quadro 1** – Perfil do diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm) e produção embrionária de
 8 doadoras Quarto de Milha (N = 15), dos grupos de animais jovens (≤ 9 anos) *versus* velhas (\geq
 9 10 anos) e com baixa (≤ 7 folículos) ou alta (≥ 8 folículos) contagem de folículos antrais
 10 (CFA).

| Variáveis | Jovens (M \pm SE) | Velhas (M \pm SE) | Valor de p | Baixa (M \pm SE) | Alta (M \pm SE) | Valor de p |
|------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm) | 38,6 \pm 0,3 | 37,5 \pm 0,9 | 0,219 | 38,2 \pm 0,5 | 38,4 \pm 0,5 | 0,758 |
| Número de embriões | 0,6 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,1 | 0,290 | 0,5 \pm 0,1 | 0,6 \pm 0,1 | 0,474 |

11

12 Ademais, foi observado apenas no grupo de alta CFA, diferença quanto ao número de
 13 folículos antrais entre o ovário direito e esquerdo ($p = 0,034$). Ao contrário do estudo
 14 realizado por Claes et al. (2015), o qual revela uma maior CFA no ovário direito em
 15 comparação ao esquerdo, independente do grupo de idade das éguas ($p = 0,03$).

16

17 Por fim, este estudo traz informações inéditas no que diz respeito a influência que a
 18 idade e da CFA exercem sobre a taxa diária de crescimento folicular; diâmetro do folículo
 19 pré-ovulatório; grau de edema uterino e produção embrionária em éguas doadoras da raça
 20 Quarto de Milha. Tais informações servem como base para posteriores estudos, a fim de se
 21 obter maiores informações sobre a fertilidade destes animais, visto a escassez de trabalhos
 realizados sobre o assunto na espécie equina.

22

1 CONCLUSÃO

2

3 A presente pesquisa sugere novos conceitos a respeito da relação entre idade e CFA
4 sobre características reprodutivas da espécie equina. Observa-se que éguas mais jovens e
5 com maior CFA apresentam uma maior taxa de crescimento folicular, bem como uma maior
6 quantidade de folículos antrais ovarianos, em comparação aos animais mais velhos. E ainda,
7 que há uma variação no grau de edema uterino de acordo com a CFA das éguas. Além disso,
8 não se nota diferença no que diz respeito da interferência destas variáveis sobre o diâmetro
9 do folículo pré-ovulatório e recuperação embrionária de éguas.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 **REFERÊNCIAS**

- 2 BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J.
3 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation
4 among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum
5 follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.
6
- 7 CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and
8 reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 1101-15, 1992.
9
- 10 CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J.J.; CONLEY,
11 A.J.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The interrelationship between anti-Müllerian
12 hormone, ovarian follicular populations and age in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n.
13 5, p. 537-541, 2015.
14
- 15 CLAES, A. et al. Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral
16 follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. **Equine Veterinary Journal**, v. 48,
17 n. 6, p. 741-748, 2016.
18
- 19 CLAES, A. et al. The influence of age, antral follicle count and diestrous ovulations on
20 estrous cycle characteristics of mares. **Theriogenology**, v. 97, p. 34-40, 2017.
21
- 22 CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.;
23 FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef
24 cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal**
25 **Animal Science**, v.87, p.1971–1980, 2009.
26
- 27 GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG,
28 M.A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares.
29 **Reproduction, Fertility and Development**. v. 20, n. 8, p. 955-963, 2008.
30
- 31 GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; JACOB, J.C.; BEG, M.A. Age-related
32 dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares.
33 **Theriogenology**. v. 71. p. 780-788, 2009.
34
- 35 IRELAND, J. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZA, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGERA, J.
36 K.; IRELAND, J. L. H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Does size matter in
37 females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian
38 function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and
39 causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and**
40 **Development**, v.23, p.1–14, 2011.
41
- 42 IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.;
43 LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
44 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
45 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–
46 1695, 2007.
47
- 48 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
49 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND,

- 1 J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
2 follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.
3
- 4 MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.;
5 LONERGAN, P.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in antral
6 follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in
7 cattle. **Reproduction**, v.140, p.713–720, 2010.
8
- 9 MOSSA F.; WALSH, S.W.; LER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
10 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
11 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
12 p.2355–2361, 2012.
13
- 14 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
15 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
16 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In
17 Vivo – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
18 **Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014.
19
- 20 SCARLET, D. et al. 120 Antral Follicle Count Of 2-Year-Old Mares Is Highly Correlated With
21 Anti-Müllerian Hormone Concentrations At 24 To 28 Weeks Of Age. **Reproduction, Fertility**
22 **and Development**, v. 29, n. 1, p. 168-169, 2017.
23
- 24 STOJSIN-CARTER, A. et al. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences
25 in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Animal reproduction**
26 **science**, v. 167, p. 51-58, 2016.
27
- 28 MCCUE, P.M.; SCOGGIN, C.F.; LINDHOLM A.R.G. Estrus. In: McKinnon, A.O.; Squires,
29 E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. **Equine Reproduction**. 2ª edição. Philadelphia, Londres:
30 Wiley-Blackwell, p. 1716 – 1727, 2011.
31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37

6. CONSIDERAÇÕES

- Éguas jovens, bem como as de alta CFA, possuem maior taxa de crescimento folicular em comparação às éguas velhas e de baixa CFA;
- Éguas jovens apresentam maior quantidade de folículos antrais ovarianos em comparação às éguas velhas;
- Éguas com alta CFA apresentam uma maior variação do grau de edema uterino durante as avaliações, bem como maior grau de edema quando prestes a ovular em comparação às éguas com menor CFA;
- Éguas com alta CFA apresentam maior quantidade de folículos antrais no ovário direito em comparação ao ovário esquerdo;
- Não há diferença quanto ao diâmetro do folículo pré-ovulatório e colheita de embriões em relação à idade e CFA de éguas.