



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SHEILA MERLO GARCIA

**EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS DAS
RAÇAS NELORE E GIROLANDO**

Londrina
2017

SHEILA MERLO GARCIA

**EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS DAS
RAÇAS NELORE E GIROLANDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2017

SHEILA MERLO GARCIA

**EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES DE VACAS DAS RAÇAS NELORE E
GIROLANDO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dra. Raquel Zaneti Puelker
Progest biotecnologia

Profa. Dra. Wanessa Blaschi
Universidade do Norte do Paraná - UENP

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

**Dedico essa tese às pessoas cujas
vidas e exemplos influenciaram
minhas escolhas...**

*À minha tão querida e amada
avó Catharina, sempre presente
em todas as conquistas da minha
vida, e que agora continua
torcendo por mim, ao lado do
Pai.*

*Aos meus pais e irmã Sérgio,
Antonieta e Juliana.*

Ao meu marido Ricardo.

*Aos meus preciosos filhos
Cecília e Gabriel.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da vida. Por ter me concedido saúde e sabedoria para conduzir e alcançar mais essa vitória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Seneda, pelo privilégio de ser sua orientanda. Obrigada pelo seu acolhimento e pelas oportunidades de aprendizado. Por toda paciência, confiança e por acreditar no meu potencial. Agradeço também pelas conversas reconfortantes, principalmente nos momentos de desânimo e dificuldade...jamais esquecerei.

Aos meus pais Sergio e Antonieta, que com sua fé e amor incondicional, me educaram e me inspiraram. Vocês são exemplo de força e determinação. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, orando e apoiando todas as minhas decisões pessoais e profissionais. Espero ser motivo de orgulho para vocês.

Ao meu marido, companheiro de todas as horas e maior incentivador, por compreender minhas escolhas, aceitar e participar concretamente da realização dos meus sonhos. Obrigada por cuidar de mim e da nossa família com tanto amor e dedicação. Amo você!

Aos meus tesouros mais preciosos, meus filhos Cecília e Gabriel, que mesmo tão pequeninos souberam compreender minha ausência em momentos importantes.

Aos meus sogros, Sidnei e Lenir, minha irmã Juliana e meu cunhado Caio, obrigada pelo zeloso cuidado com meus filhos em todos os momentos que precisei.

Ao grupo "Jovens SJO", meus amigos de infância, que me acompanharam em mais esse caminho. Por todas palavras de incentivo, força e torcida.

Às minhas amigas Adriana e Marilice, muito obrigada por fazerem parte da minha vida. Pelo ombro amigo, pelo carinho, pela ajuda e principalmente pela amizade.

Aos queridos colegas do Repra, por me acolherem calorosamente e socorrerem prontamente, diminuindo a distância entre Presidente Prudente e Londrina.

Aos funcionários da UEL e da UNOESTE, por toda paciência, disposição e suporte institucional.

À minha coordenadora e amiga Ana Claudia, pela compreensão e carinho. Obrigada por todo apoio e por tornar possível a conciliação entre o trabalho e a condução deste doutorado.

À amiga Raquel, por compartilhar abertamente comigo seus conhecimentos, contribuindo imensamente para a condução e conclusão deste trabalho.

Ao veterinário e amigo Kleber, pelas valiosas sugestões e pelo auxílio na coleta dos dados.

Ao veterinário José Otávio, pela parceria e confiança, por realizar as aspirações e por disponibilizar o laboratório para produção dos embriões.

Ao Eduardo, pelas orientações referentes aos aspectos estatísticos do trabalho.

Às professoras Claudia Membrive, Caliê Castilho, Gisele Mingoti pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos alunos e orientandos por toda paciência e torcida. Obrigada por tudo que me ensinaram e por acreditarem no meu sucesso.

À todos que conviveram comigo durante a realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

“Não deixe de falar as palavras deste Livro da Lei e de meditar nelas de dia e de noite, para que você cumpra fielmente tudo o que nele está escrito. Só então os seus caminhos prosperarão e você será bem-sucedido.” (Josué 1, 8)

" Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar."
Madre Teresa de Calcutá

GARCIA, Sheila Merlo. **Efeito da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões de vacas das raças Nelore e Girolando**. 2017. 88f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O desenvolvimento de alternativas para otimizar a produtividade do rebanho é o desafio atual dos pesquisadores. Muitos estudos demonstram relação positiva entre a contagem de folículos antrais (CFA) e parâmetros de fertilidade do rebanho bovino e apontam essa característica como uma importante e confiável ferramenta, que poderia tornar mais eficiente a seleção de doadoras com alto potencial de produção de embriões *in vitro* (PIVE). O objetivo do primeiro estudo foi avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Nelore (*B. indicus*) com alta e baixa CFA. Fêmeas com idade entre 24 e 36 meses foram classificadas como vacas de alta CFA (entre 23-40 folículos, n = 8) e vacas de baixa CFA (entre 6-12 folículos, n = 8). Todos os animais foram previamente sincronizados; cinco dias depois submetidos à OPU, e os oócitos recuperados enviados para PIVE. A produção de embriões foi avaliada no terceiro dia após a inseminação para se determinar as taxas de clivagem; no sétimo e décimo dia, para se avaliar a taxas de blastocisto. Os dados obtidos foram considerados não paramétricos e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$), e as porcentagens pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). O grupo de alta CFA, comparativamente ao grupo de baixa CFA, obteve maiores médias de oócitos aspirados/OPU ($30,1 \pm 14,9$ vs. $7,9 \pm 3,8$; $p < 0,01$); oócitos cultivados/OPU ($24,6 \pm 12,3$ vs. $5,9 \pm 2,8$; $p < 0,01$). A porcentagem de clivagem em relação aos oócitos cultivados não foi diferente entre os dois grupos ($80,4\%$ vs. $75,6\%$; $p < 0,01$) e as porcentagens de blastocistos no D7 e no D10 em relação aos oócitos cultivados, do grupo com alta CFA ($39,8\%$ e $41,8\%$, $p < 0,01$), foram superiores ao grupo com baixa CFA ($26,1\%$ e $29,0\%$, $p < 0,01$). Portanto, foi possível concluir que animais da raça Nelore com maior CFA apresentam melhores taxas de PIVE. O segundo estudo teve como objetivo avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Girolando (*B. indicus* x *B. Taurus*) com alta e baixa CFA ovarianos, bem como a taxa de prenhez nas receptoras destes embriões. Para tanto, a CFA foi avaliada por ultrassonografia antes de cada sessão de OPU. As doadoras submetidas a 3-5 OPU foram classificadas como vacas de alta CFA (entre 35-52 folículos, n = 13), e vacas de baixa CFA (entre 11-17 folículos, n = 15). Os oócitos recuperados foram enviados para PIVE. A produção de embriões foi avaliada no sétimo dia após a inseminação, para se determinar as taxas de blastocistos; e a taxa de prenhez foi observada aos 30 dias após a transferência. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e as porcentagens pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). O grupo de alta CFA, comparativamente ao grupo de baixa CFA, obteve maiores médias de oócitos aspirados/OPU ($42,6 \pm 5,2$ vs $14,6 \pm 1,9$; $p < 0,01$); oócitos cultivados/OPU ($38,1 \pm 6,6$ versus $12,3 \pm 2,8$; $p < 0,01$); porcentagens de blastocistos no D7 em relação aos oócitos cultivados ($23,0\%$ vs. $18,4\%$, $p < 0,05$); porcentagem de prenhez em relação ao total de blastocistos transferidos ($42,7\%$ vs. $39,7\%$, $p < 0,05$). Portanto, pode-se concluir que na produção *in vitro* de embriões, melhores taxas de blastocisto e prenhez são obtidas de vacas da raça Girolando com maiores contagens de folículos antrais.

Palavras-chave: *Bos indicus*. *B. indicus* x *B. taurus*. Oócito. PIVE. Taxa de Prenhez.

GARCIA, Sheila Merlo. **Effect of the count of antral follicles on the *in vitro* embryo production in Nelore and Girolando cows.** 2017. 88 f. Thesis (Doctorate in Animal Science) – University State of Londrina. Londrina. 2017.

ABSTRACT

Many studies evidence a positive correlation between the antral follicles counting (AFC) and livestock fertility parameters and appoint this characteristic as an important and reliable tool, which could enhance efficiently the selection of high production potential donors of *in vitro* embryos. Thus, the aim of the first study was to evaluate the *in vitro* production potential of bovine embryos obtained from Nelore cows presenting high or low number of ovarian antral follicles, through the assessment of a great number of OPUs carried out in pre-synchronized follicular waves. The Nelore (*Bos indicus*) cows aging from 24 to 36 months were classified as high-AFC cows, when presented an average of 23 to 40 follicles (n = 8), and low-AFC cows, when presented an average up to 12 follicles (n = 8). All animals were synchronized and were submitted to OPU five days later. Recovered oocytes underwent *in vitro* maturation, fertilization and culture. Embryo production rates were assessed. The data were considered non-parametric and analyzed by the Kruskal-Wallis Test, for independent samples (p<0,01). The percentages were analyzed by Chi-square Test (p<0,05). Were aspirated 1445 oocytes from high-AFC cows and 381 oocytes from low-AFC. The high-AFC group, compared to the low-AFC group, obtained higher mean aspirated oocytes/OPU (30.1 ± 14.9 vs. 7.9 ± 3.8; p<0.01); and cultured oocytes/OPU (24.6 ± 12.3 vs. 5.9 ± 2.8, p <0.01). Percentage of cleavage in relation to cultured oocytes wasn't different between the two groups (80.4% vs. 75.6%, p <0.01) and the percentage of blastocysts, in D7 and D10, about relation to cultured oocytes, were superior of the group with high-AFC (39.8% and 41.8%, p <0.01) comparison to the group with low-AFC (26.1% and 29.0%, p <0.01). Therefore, it is possible to conclude that high-AFC animals achieve better IVEP rates than females with small antral follicle count. The second study aimed to investigate embryo production and pregnancy rates obtained from Girolando (*B. indicus* x *B. taurus*) cows with high and low antral follicle count. The antral follicles counting of cows was assessed through by ultrasonography before every OPU session. Donors were classified as high-AFC cows, (average of 35 to 52 follicles; n = 13), and low-AFC cows (average of 11 to 17 follicles; n = 15) and submitted to 3-5 OPUs with a 14-day interval. Oocytes recovered underwent *in vitro* maturation, fertilization and culture prior being transferred to recipient cows. Embryonic development was assessed 3, and 7 days post-fertilization through cleavage and blastocyst rates, and pregnancy rate was assessed on 30 days after the transfer. The obtained data were considered non-parametric and analyzed by the Kruskal-Wallis test for independent samples, and the chi-square test percentages (both p<0,05). Were aspirated 1919 oocytes from high-AFC cows and 775 low-AFC cow oocytes. The high-AFC group, compared to the low-AFC group, obtained higher mean values of aspirated oocytes/OPU (42.6 ± 5.2 vs. 14.6 ± 1.9; p <0.01); cultured oocytes/OPU (38.1 ± 6.6 versus 12.3 ± 2.8; p <0.01); percentages of blastocysts in D7 relationship to cultured oocytes (23.0% vs. 18.4%, p <0.05); percentage of pregnancy in relation to total blastocysts transferred (42.7% vs. 39.7%, p <0.05). In conclusion, higher pregnancy rates are obtained from females with larger antral follicle count.

Key words: *Bos indicus*. *B. indicus* x *B. taurus* . Oocyte. IVEP. Pregnancy rate.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 01: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE

- Tabela 1 - Número total e média por OPU de oócitos aspirados e cultivados de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).63
- Tabela 2 - Número total e média por OPU de embriões clivados e blastocistos (BI), no D7 e D10, de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).64
- Tabela 3 - Número total e porcentagem de embriões clivados e blastocistos (BI) em relação ao número de oócitos cultivados de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).64

ARTIGO 02: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS DE VACAS DA RAÇA GIROLANDO NA TAXA DE BLASTOCISTO E PRENHEZ DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

- Tabela 1 - Número total e média por OPU de oócitos aspirados e cultivados de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos).78
- Tabela 2 - Número total e média por OPU de blastocistos (BI) produzidos no D7, e blastocistos transferidos de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos) e numero total e média de prenhez por OPU nas receptoras destes embriões.78

Tabela 3 - Número total e porcentagem de blastocistos (BI) no D7 em relação ao número de oócitos cultivados; número total e porcentagem de BI transferidos em relação ao número de BI total D7 de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos); e número total e porcentagem de prenhez nas receptoras destes embriões.79

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 01: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE

- Figura 1 - Protocolo hormonal de sincronização de onda folicular das doadoras realizado antes dos procedimentos de OPUs.59
- Figura 2 - Figura esquemática da produção in vitro e avaliação das taxas de clivagem e blastocisto.62

ARTIGO 02: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS DE VACAS DA RAÇA GIROLANDO NA TAXA DE BLASTOCISTO E PREENHEZ DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

- Figura 1 - Figura esquemática da produção in vitro, avaliação das taxas de blastocisto e prenhez.....75
- Figura 2 - Protocolo hormonal de sincronização de ovulação utilizado em vacas receptoras dos embriões, e esquema cronológico de aspiração de doadoras.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| µm | Micrograma |
| AMH | Hormônio anti-Mülleriano |
| CFA | Contagem de folículos antrais |
| CGP | Células germinativas primordiais |
| CL | Corpo lúteo |
| COC's | Complexo cumulus-oócito |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GWAS | Genome Wide Association Study |
| IA | Inseminação artificial |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| IGF1 | Insulina do tipo 1 |
| IM | Intramuscular |
| Kg | Quilograma |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| mg | Miligramas |
| MHz | Mega-hertz |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetros |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| ng | Nanograma |
| OPU | Aspiração folicular guiada por ultrassom |
| PFA | População folicular antral |
| PIVE | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| SNP | Polimorfismo de base única |
| SOV | Superovulação |
| TE | Transferência de embriões |
| µg | Micrograma |
| VG | Vesícula germinativa |
| vs | Versus |

SUMÁRIO

| | | |
|------------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 | OOGÊNESE..... | 17 |
| 2.2 | FOLICULOGÊNESE | 19 |
| 2.2.1 | Desenvolvimento Pré-antral | 20 |
| 2.2.2 | Desenvolvimento Antral..... | 21 |
| 2.3 | DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM BOVINOS | 23 |
| 2.3.1 | Recrutamento | 24 |
| 2.3.2 | Seleção | 25 |
| 2.3.3 | Desvio | 25 |
| 2.3.4 | Dominância | 26 |
| 2.4 | POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL EM BOVINOS | 27 |
| 2.4.1 | Causas da variabilidade na contagem de folículos antrais..... | 28 |
| 2.5 | INFLUÊNCIAS DA CFA NA FERTILIDADE DA ESPÉCIE BOVINA | 32 |
| 2.5.1 | Tamanho do ovário e do aparelho reprodutor | 33 |
| 2.5.2 | Concentração de hormônios | 33 |
| 2.5.3 | Qualidade de oócito..... | 36 |
| 2.6 | INFLUÊNCIAS DA CFA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES..... | 38 |
| 2.7 | INFLUÊNCIAS DA CFA NA TAXA DE PREENHEZ..... | 40 |
| | REFERÊNCIAS | 42 |
| 3 | HIPÓTESES | 53 |
| 4 | OBJETIVOS | 54 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 54 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 54 |
| 5 | ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO | 55 |
| ARTIGO 01 | EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE | 55 |

| | | |
|--------------------|-------|----|
| Resumo | | 55 |
| Abstract: | | 56 |
| Introdução | | 57 |
| Material e Métodos | | 58 |
| Resultados | | 63 |
| Discussão | | 64 |
| Conclusões | | 67 |
| Referências | | 67 |

**ARTIGO 02 EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS DE VACAS DA RAÇA
GIROLANDO NA TAXA DE BLASTOCISTO E PREENHEZ DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO70**

| | | |
|--------------------|-------|----|
| Resumo: | | 70 |
| Abstract: | | 70 |
| Introdução | | 71 |
| Material e Métodos | | 72 |
| Resultados | | 78 |
| Discussão | | 79 |
| Conclusões | | 82 |
| Referências | | 82 |

7 DISCUSSÃO GERAL86

8 CONCLUSÕES89

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo atualmente o segundo maior produtor de carnes, com aproximadamente 215 milhões de cabeças, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016). A Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2016) relatou, no ano de 2015, que a cadeia produtiva da pecuária no Brasil movimentou em torno de 483 bilhões de reais e apresentou crescimento acima de 27% em relação ao ano anterior. Nesse contexto, a bovinocultura tem papel de destaque. O país é ainda o quinto maior produtor mundial de leite (35 bilhões de litros), e possui o segundo maior rebanho de vacas ordenhadas, com aproximadamente 15 milhões de cabeças (USDA, 2015).

Animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) compõem 80% do rebanho total de bovinos, sendo que a raça Nelore representa 90% do rebanho de corte, e pode ser encontrada por todo o território nacional, devido às suas características de rusticidade e adaptabilidade às condições climáticas brasileiras (ABIEC, 2015). No entanto, principalmente na bovinocultura de leite, pode-se encontrar uma quantidade maior de animais de origem europeia (*Bos taurus*) ou mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*) (MIRANDA; FREITAS, 2009). De acordo com estes autores, o cruzamento entre animais zebuínos e europeus vem sendo cada vez mais utilizado por criadores brasileiros, com objetivo de aumentar a rusticidade e a produtividade do rebanho sob condições adversas. Animais da raça Girolando (híbrido das raças Gir e Holandês) mantêm estas características do gado *Bos indicus* e representam a maioria no rebanho leiteiro do Brasil e são responsáveis por cerca de 80% da produção nacional de leite (NANZER, 2010).

A busca constante por rebanhos com índices zootécnicos cada vez melhores vem tornando a pecuária brasileira uma referência mundial. Para que continue a avançar e conquiste cada vez mais destaque, é necessário atrelar o potencial produtivo ao melhoramento genético, através de programas que selecionem os melhores reprodutores e matrizes para produção de carne e leite.

O aumento gradativo do uso de biotécnicas da reprodução animal vem contribuindo significativamente para acelerar o ganho genético do rebanho (PONTES et al., 2009; NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010). Técnicas como

inseminação artificial (IA); inseminação artificial em tempo fixo (IATF); superovulação (SOV); transferência de embrião (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), associada à aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU – sigla de *ovum pick-up*), são ferramentas de extrema importância, que favorecem a multiplicação e a seleção de animais de méritos produtivo e genético superiores (SANTOS et al., 2016).

Desde sua introdução e aplicação comercial nos rebanhos bovinos brasileiros, na década de 1990, a OPU/PIVE foi preferencialmente usada na bovinocultura de corte, para obtenção de doadoras *B. indicus* e *B. indicus* x *B. taurus*. No entanto, atualmente, com a possibilidade do uso do sêmen sexado, essa ferramenta vem sendo procurada e utilizada com grande sucesso por criadores de gado leiteiro, favorecendo a produção de um maior número de fêmeas (VIANA et al., 2012).

A produção mundial de embriões *in vitro* ultrapassou meio milhão em 2013, com destaque para a América do Sul, responsável por 73% desses embriões (BLONDIN, 2015). O Brasil é o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo (320 mil embriões por ano) (MAPA, 2016), graças ao potencial reprodutivo do rebanho bovino nacional e aos avanços na pesquisa. Estudos demonstram que fêmeas *Bos indicus* possuem mais folículos e taxa de recuperação de oócitos superior quando comparadas às fêmeas *Bos taurus* (PONTES et al. 2011), proporcionando a produção de maior número de embriões.

Existem evidências de que a população folicular antral (PFA), está diretamente relacionada com a fertilidade do rebanho, e que a quantidade de folículos que emergem durante a onda folicular pode influenciar a qualidade oocitária e, conseqüentemente, a produção de embriões e taxa de prenhez (IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012). Muitos estudos apontam essa característica como uma importante ferramenta, que poderia estimar o potencial reprodutivo do animal e tornar mais eficiente a seleção de doadoras com alta capacidade para produção *in vitro* de embriões (RICO et al., 2012; STOJSIN-CARTER et al., 2016).

Os resultados obtidos por distintos grupos de pesquisa são altamente controversos, reforçando que ao inferir conclusões, deve-se considerar as diferenças entre subespécies (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*), idade dos animais, número de OPU e a biotécnica utilizada (MOSSA et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nessas diferenças e a influência da PFA sobre a fertilidade é de grande importância para o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida e para o desenvolvimento de alternativas que otimizem a produtividade do rebanho. Deve-se ressaltar que, até o momento, inexistem trabalhos que avaliaram essa questão em cruzamentos de animais *B. indicus* x *B. taurus* voltados à produção de leite.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos: avaliar a influência da contagem folículos antrais ovarianos sobre a produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Nelore quando submetidas a aspirações foliculares; e avaliar a influência da contagem folicular antral sobre a produção *in vitro* de embriões e sobre a taxa de prenhez das receptoras destes embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OOGÊNESE

Define-se como oogênese o processo de formação dos gametas femininos mediante uma série de eventos pelos quais as células germinativas primordiais (CGP) passam até atingirem o estágio de oócito maduro (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A oogênese, nos mamíferos, inicia-se antes do nascimento, durante o desenvolvimento embrionário, e é completada somente após a fecundação, podendo ser dividida em dois períodos: pré-natal e pós-natal. Em consequência da alta interdependência entre gameta e células foliculares, a oogênese acontece paralelamente à folículoogênese (GILCHRIST, 2011).

As células germinativas primordiais (CGP) são responsáveis pela formação dos gametas femininos ou oócitos. Na fase pré-natal, as CGP migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas gonadais, com a finalidade de colonizar as gônadas que ainda se encontram em processo de formação, sofrem sucessivas mitoses e dão origem às oogônias (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesta etapa, também se desenvolvem os cordões corticais, estruturas precursoras dos folículos primordiais, que contêm CGP circundadas por uma camada de células da pré-granulosa (JUENGEL et al., 2002).

Posteriormente, as oogônias, que se encontram no interior dos cordões corticais, se proliferam por novas divisões mitóticas, diferenciam-se em oócitos primários e são individualizados, formando assim os folículos primordiais (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006), marcando o início da folículoogênese. Após a formação do folículo primordial, as células foliculares, que circundam os oócitos primários param de se multiplicar e só retomam sua proliferação quando este começar a crescer (HIRSHFIELD, 1991).

Os oócitos primários iniciam o processo de divisão meiótica, que sofre sua primeira parada na fase de Prófase I (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesse momento, o núcleo do oócito encontra-se em fase de vesícula germinativa (VG) e, em fêmeas bovinas, permanece assim durante o término do desenvolvimento embrionário

até imediatamente antes da ovulação na fase de puberdade (MOORE; PERSAUD, 1994).

No início da vida reprodutiva da fêmea, a oogênese tem continuidade de maneira sincronizada com o desenvolvimento folicular. Na medida em que os folículos primordiais se desenvolvem para folículos primários até pré-ovulatórios, os oócitos primários apresentam intenso e contínuo crescimento, passando de 20-25 μm para 120 μm em folículos pré-ovulatórios (SALHA; ABUSHEIKHA; SHARMA, 1998). Durante o crescimento, passam por intensa atividade metabólica e sofrem diversas modificações estruturais em busca da aquisição da competência oocitária (HAPER, 1994), entre elas, a transcrição e acúmulo de mRNA maternos, resultando no aumento da síntese de proteínas (HYTTEL et al., 1997), e no acúmulo de gotículas de lipídeos, que servirão de reserva energética para o desenvolvimento embrionário inicial (HAPER, 1994). Alterações das organelas também são marcantes nesse período, como o aumento na quantidade de ribossomos e mitocôndrias e o deslocamento do Complexo de Golgi para a periferia do oócito.

O surgimento da zona pelúcida também acontece nesse período do crescimento do oócito. As células foliculares do folículo primário sofrem divisões e dão origem a uma camada de células estratificadas, chamada de camada da granulosa. Entre a camada da granulosa e o oócito surge a zona pelúcida, membrana glicoproteica ao redor do oócito e tem como principais funções bloquear a polispermia e proteger o embrião no início do seu desenvolvimento (HYTTEL et al., 1997).

Por último, ocorre o aparecimento dos grânulos corticais, que são organelas exclusivas dos oócitos, em forma de pequenas vesículas, que atuam principalmente no endurecimento da zona pelúcida no momento da fecundação e também na prevenção da polispermia (HAPER, 1994).

Após o período de desenvolvimento, os oócitos primários podem passar pelo processo de maturação ou sofrer atresia. A maturação do oócito ocorre durante a formação do folículo pré-ovulatório (estádio terminal do desenvolvimento folicular) e culmina com a formação do oócito secundário.

Em resposta aos estímulos dos hormônios LH os oócitos retomam e completam o primeiro ciclo meiótico (MOORE; PERSAUD, 1994; MAYES; SIRARD, 2001), passando pelas fases de metáfase I, anáfase I, telófase I, e finalizando com a

extrusão do primeiro corpúsculo polar. Em seguida, inicia-se a segunda divisão meiótica, que, ao atingir a metáfase II, sofre a segunda parada, formando o oócito secundário, que permanecerá nesta fase até o momento da ovulação e fecundação (AUSTIN; SHORT, 1982).

Após a ovulação, o oócito retoma a segunda divisão meiótica e libera o segundo corpúsculo polar. Esses eventos marcam o fim da oogênese, a retomada da condição diploide e, conseqüentemente, a formação do zigoto (MOORE; PERSAUD, 1994; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

2.2 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese acontece simultaneamente à oogênese; no entanto, inicia-se depois e termina antes. Compreende um processo contínuo de formação, crescimento e maturação ou atresia dos folículos ovarianos (NILSSON; SKINNER, 2001), começando com o desenvolvimento do folículo primordial durante a vida fetal (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O folículo localiza-se no córtex ovariano, e é composto por um oócito rodeado por uma ou mais camadas de células foliculares, também conhecidas como células da granulosa. Representa a unidade estrutural e funcional do ovário, sendo responsável por proporcionar um ambiente favorável para o crescimento e maturação de oócitos primários e garantir o processo de ovulação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Desempenha principalmente duas funções: endócrina e exócrina (ou gametogênica), apresentando-se como elemento fundamental para a manutenção da viabilidade oocitária.

A foliculogênese pode ser dividida em duas fases, pré-antral e antral, de acordo com o grau de evolução dos folículos. Na fase pré-antral, acontece a formação dos folículos primordiais, primários e secundários, que se diferenciam pela forma e quantidade de camadas de células da granulosa que circundam o oócito (HULSHOF et al., 1994, FAIR, 2003). A fase antral caracteriza-se principalmente pela formação da cavidade antral nas células da granulosa e pela presença de líquido folicular. Nessa fase, os folículos secundários desenvolvem-se em folículos terciários e finalizam com a formação do folículo maduro (SALHA; ABUSHEIKHA; SHARMA, 1998; VAN DEN HURK et al., 2000)

2.2.1 Desenvolvimento Pré-antral

A primeira categoria de folículo é denominada de folículo primordial. Sua formação se inicia durante o desenvolvimento embrionário, com cerca de 90 a 120 dias de gestação em bovinos (TANAKA et al., 2001; MAYES; SIRARD, 2002), com a parada da primeira divisão meiótica. No momento em que ocorre a transformação das oogônias em oócitos primários, tem-se a separação dos cordões corticais, e a individualização desses oócitos (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Os folículos primordiais são folículos pré-antrais, localizados na região periférica do córtex ovariano, constituídos por oócitos primários em prófase I (MOORE; PERSAUD, 1994), envolvidos por uma única camada de células achatadas da pré-granulosa. Após a sua formação, entram em período de quiescência e só retomam seu crescimento após o nascimento, de acordo com o mecanismo de ativação folicular (HIRSHFIELD, 1991).

Os folículos primordiais constituem um *pool* de reserva de milhares de oócitos, não renováveis, do qual, após o nascimento, apenas um pequeno número será recrutado e estimulado a desenvolver até à ovulação (LIU et al., 2001). No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a formação de novas células germinativas após o nascimento, em mulheres (BUKOVSKY et al., 2004) e camundongos adultos (JOHNSON et al., 2005), indicando uma possível renovação após o nascimento.

De acordo com Ireland (1987) aproximadamente 99,9% desses folículos acabam morrendo por um processo fisiológico degenerativo denominado apoptose ou atresia folicular. Sabe-se que a seleção e o desenvolvimento dos folículos são regulados por fatores intraovarianos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005); entretanto, até hoje esses mecanismos não são bem esclarecidos.

A continuidade do crescimento folicular na fase pré-antral caracteriza-se principalmente, por alterações morfológicas, tais como: crescimento e maturação do oócito primário; multiplicação e diferenciação das células foliculares (células da granulosa); formação da zona pelúcida e reorganização das células ovarianas (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Essas alterações acontecem de forma gradativa na medida em que os folículos alcançam as fases de folículo primário e secundário. À medida que os folículos primordiais se desenvolvem, as células que circundam os oócitos primários voltam a se multiplicar e a camada de células

achatadas passam a ter formato cuboide, dando origem ao folículo primário (HULSHOF et al., 1994). Esta transição ocorre lentamente, de acordo com o aumento de tamanho do oócito (HIRSHFIELD, 1991; SALHA; ABUSHEIKHA; SHARMA, 1998).

Os folículos são denominados secundários quando há intensa multiplicação das células da granulosa. Esses folículos apresentam um oócito com duas ou mais camadas de células cuboides da granulosa ao seu redor (HULSHOF et al., 1994), e a zona pelúcida ao redor do oócito torna-se evidente (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997). As células da teca externa começam a se desenvolver (BARNETT et al., 2006), e tornam-se bem definidas quando os folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI et al., 2001).

Nessa fase também se formam as junções GAP (HYTTEL et al., 1997), que são canais que possibilitam a comunicação entre células da granulosa e oócito, para transferência de nutrientes, íons inorgânicos (KIDDER; MHAWI, 2002) e sinais inibitórios ou estimulatórios da meiose (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

2.2.2 Desenvolvimento Antral

A evolução do folículo secundário ao estágio terciário, marca o início da fase antral do desenvolvimento folicular. Nos bovinos, vários folículos antrais são recrutados e iniciam seu crescimento simultaneamente em uma onda folicular, mas apenas um folículo é selecionado e finaliza seu desenvolvimento, adquirindo capacidade ovulatória.

Esta fase é altamente dependente das gonadotrofinas (FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 1996), e caracteriza-se pelo crescimento de um grupo de folículos com 3 a 4 mm de diâmetro e surgimento de uma pequena cavidade, denominada antro (DRIANCOURT, 2001), devido a intensa proliferação e reorganização em várias camadas das células da granulosa.

Posteriormente, a cavidade antral será preenchida pelo líquido folicular, formado principalmente a partir de secreções das células foliculares (esteroides, fatores de crescimento, enzimas e lipoproteínas) (BARNETT et al., 2006).

As células da granulosa, durante a transição para a fase antral, diferenciam-se em células do cumulus oophorus e células murais da granulosa (VAN

DEN HURK; ZHAO, 2005). As células do cumulus estão diretamente associadas ao oócito, formando o complexo cumulus-oócito (COC's), e têm como principal função fornecer suporte nutricional para o desenvolvimento e crescimento deste (HAGHIGHAT; VAN WINKLE, 1990). As células murais circundam a parede folicular interna, dão suporte ao crescimento do folículo (LI et al., 2000) e são fundamentais na esteroidogênese, ou seja, produção dos hormônios esteroides que agem principalmente na função ovariana (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

Durante a formação da cavidade antral, as células da teca também sofrem alterações morfológicas e funcionais. Estas se comprimem periféricamente e o estroma ovariano se condensa formando uma camada de células denominada teca interna. Assim, as células da teca diferenciam-se em teca interna – células que se localizam próximas da membrana basal – e teca externa – células próximas à periferia do folículo (CHAVES et al., 2010).

Em consequência desses eventos, observa-se ainda um aumento acentuado do diâmetro folicular. No início da fase antral, folículos secundários podem apresentar diâmetros similares aos folículos terciários; mas, devido ao contínuo acúmulo de fluido folicular (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006), os terciários rapidamente aumentam de tamanho, passando de aproximadamente 200 μm a mais que 3 mm (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Durante todo este período de desenvolvimento folicular, o oócito permanece na Prófase I da meiose. Ao atingir 3 mm de tamanho, os folículos podem ser identificados por ultrassonografia, e puncionados pela técnica de aspiração folicular (GINTHER et al., 2003).

No último estágio do desenvolvimento folicular, apenas um folículo será selecionado e dará origem ao folículo pré-ovulatório. Este folículo caracteriza-se pela presença de um oócito primário circundado por muitas células do cumulus. Devido ao aumento da liberação do LH, as células da granulosa param de se multiplicar, inicia-se o processo de formação do corpo lúteo e o oócito é estimulado a retomar e completar a primeira divisão celular (DRIANCOURT, 2001). Com o folículo já desenvolvido, a ovulação do complexo cumulus-oócito ocorre caracterizando o término da foliculogênese.

2.3 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM BOVINOS

O estudo da dinâmica folicular ovariana tem como objetivo conhecer os eventos fisiológicos do sistema reprodutor feminino, especificamente aqueles que acontecem durante o ciclo estral, visando uma melhor utilização das biotecnologias da reprodução.

Na espécie bovina, a dinâmica folicular é comandada por ondas, num processo sincronizado e contínuo de recrutamento, seleção, desvio e dominância folicular (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989). Compreende o desenvolvimento folicular antral completo, do folículo terciário ao pré-ovulatório, e é regulada principalmente pela ação das gonadotrofinas hipofisárias (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Um ciclo estral pode ter uma, duas ou mais ondas de crescimento folicular (SIROIS; FORTUNE, 1988; FIGUEIREDO et al., 1997); no entanto, apenas a última onda é responsável pelo crescimento, maturação e ovulação de um único folículo dominante, sendo denominada *onda ovulatória* (FAIR, 2003). Desta maneira, durante todos os dias do ciclo estral podem ser encontradas populações de pequenos, médios e grandes folículos. O ciclo estral dos bovinos apresenta em média 18 a 24 dias e é marcado por uma fase folicular e outra luteínica. A etapa folicular tem duração de quatro a seis dias; vai desde o crescimento dos folículos até a maturação final e ovulação do folículo dominante (DROST, 1995). A fase luteínica tem duração de 14 a 18 dias e compreende o período após a ovulação, quando ocorre a formação do corpo lúteo, até a sua regressão, determinada pela produção de prostaglandina (DROST, 1995). Após o desaparecimento do corpo lúteo, inicia-se uma nova fase folicular dando continuidade ao ciclo.

O número de ondas foliculares não interfere na fertilidade do animal, podendo variar entre animais e em um mesmo animal (FIGUEIREDO et al., 1997). Pode ainda ser influenciado pela duração do ciclo e da fase luteínica (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989) ou por fatores ambientais e fisiológicos (MURPHY et al., 1991). Autores relatam que em bovinos podem ocorrer de duas a cinco ondas por ciclo estral (FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORELLI et al., 2005). No entanto, vacas zebuínas apresentam maior frequência de ciclos com três ondas (FIGUEIREDO et al.,

1997), enquanto que vacas Holandesas têm maior frequência de duas ondas (SIROIS, FORTUNE, 1988; SARTORI et al., 2004).

2.3.1 Recrutamento

A primeira fase da dinâmica folicular é chamada de recrutamento. Nessa etapa, o aumento nas concentrações plasmáticas de FSH (ADAMS et al., 1992; FORTUNE, 1994) faz com que um grupo de folículos, com diâmetro entre dois e três milímetros (FORTUNE et al., 2001), sejam selecionados para continuar o seu desenvolvimento, promovendo a emergência da primeira onda folicular. As emergências das ondas ocorrem em média no dia 0 (dia da ovulação) e no dia 10, para o ciclo com duas ondas, e nos dias 0, 9 e 16 para o ciclo com três ondas foliculares (GINTHER et al., 1996).

O número de folículos recrutados por onda apresenta grande variação entre raças e entre animais da mesma raça (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2008; 2011; EVANS et al., 2012, SILVA-SANTOS et al., 2014; MOROTTI et al., 2015, SANTOS et al., 2016). Uma vez recrutados, esse grupo de folículos entra em um curso pré-programado de crescimento similar durante 2 ou 3 dias (GINTHER et al., 2003; SARTORELLI et al., 2005; BASTOS et al., 2010) e inicia-se a fase de seleção.

2.3.2 Seleção

O fator determinante para o início da seleção é a queda da concentração de FSH. À medida que os folículos recrutados crescem, aqueles de maiores tamanhos passam a secretar inibina e estradiol, contribuindo para uma queda nos níveis circulantes de FSH, fazendo com que a concentração desse hormônio seja insuficiente para a manutenção de todos os folículos (GINTHER et al., 1996). Assim, do grupo de folículos recrutados, apenas de três a cinco folículos maiores são selecionados e continuam seu crescimento até 4-6 mm (GINTHER et al., 1996).

Os mecanismos envolvidos na seleção folicular são complexos e ainda não estão totalmente esclarecidos. Segundo Mayer et al. (2004), podem estar

envolvidos nesse processo: o tamanho do folículo, produção e concentração de hormônios esteroides, capacidade de resposta ao FSH e LH de acordo com o número de receptores para essas gonadotrofinas.

2.3.3 Desvio

O desvio do crescimento folicular representa o momento em que ocorre o crescimento do folículo dominante da onda.

Até essa fase, os dois maiores folículos da onda têm tamanho similar. No entanto, quando o maior folículo apresenta vantagem de 0,5 mm é selecionado a continuar seu crescimento e por ação endócrina, exercerá dominância sobre os demais folículos da onda, tornando-se o folículo dominante (GINTHER et al., 1996, 1997). Enquanto que, os folículos subordinados iniciam o processo de regressão ou atresia (GINTHER et al., 1996; FORTUNE et al., 2001). Nas diferentes raças taurinas e zebuínas, o desvio da primeira onda após a ovulação acontece no mesmo período, cerca de 2,3 a 2,8 dias do ciclo. Entretanto, as raças apresentam diferenças em relação ao tamanho do folículo no início do desvio. Em novilhas taurinas, da raça Holandesa, o início do desvio acontece quando o maior folículo atinge 8,5 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1996, 1997); em novilhas e vacas zebuínas, da raça Nelore, quando apresentam diâmetro em torno de 5 a 6,5 mm (SARTORELLI et al., 2005) e 6,1 a 8,2 mm (BASTOS et al., 2010), respectivamente.

Segundo GINTHER et al. (1996), o futuro folículo dominante emerge 10 horas antes do segundo maior folículo, sugerindo que o folículo pré-ovulatório leva uma vantagem de tamanho em relação aos demais desde o início do ciclo, e que a dominância é uma condição determinada no momento da emergência da onda (BARROS et al., 2008). No entanto, posteriormente, os mesmos autores sugerem que o fator primordial para o estabelecimento da dominância é a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa do folículo dominante (GINTHER et al., 2003).

2.3.4 Dominância

Após o desvio folicular, o folículo dominante continua a crescer, apesar da baixa concentração de FSH, durante aproximadamente seis dias e, ao atingir seu diâmetro máximo, permanece estático por alguns dias. A partir desse momento, dependendo da onda em que ocorreu seu crescimento, ele pode regredir ou finalizar seu crescimento e ovular (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989).

Durante a fase de dominância folicular, a concentração de LH é determinante para a definição do destino do folículo. Caso o crescimento da onda folicular ocorra na fase lútea, o folículo dominante será anovulatório. Devido a presença de um corpo lúteo ativo no ovário, altas concentrações de progesterona, fazem com que a amplitude e frequência de pulsos de LH diminuam por retroalimentação negativa, impossibilitando a maturação final do folículo (GINTHER et al., 1996). Assim, o folículo dominante também entra em atresia, perde sua dominância e uma nova onda de crescimento folicular se inicia (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989).

Entretanto, o folículo dominante será ovulatório se o seu crescimento ocorrer na última onda do ciclo, na fase folicular, quando há regressão do corpo lúteo. Essa condição induz ao pico pré-ovulatório de LH, e o folículo dominante encontra condições ideais para completar seu desenvolvimento, maturação e ovulação (GINTHER et al., 1996; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Entre os bovinos, o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios podem ter grande variação. Fêmeas zebuínas apresentam diâmetros médios entre 10 e 12 mm (FIGUEIREDO et al., 1997), enquanto que as taurinas apresentam folículos maiores, com 14 a 20 mm (GINTHER et al., 1989).

2.4 POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL EM BOVINOS

A contagem de folículos antrais (CFA), técnica utilizada para determinação da população folicular antral (PFA), tem sido considerada por muitos pesquisadores uma característica de fácil classificação fenotípica, significando uma importante e confiável ferramenta na seleção de animais com alto potencial

reprodutivo (IRELAND et al., 2011; RICO et al., 2012; BATISTA et al., 2014; SILVA-SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016, STOJSIN-CARTER et al., 2016).

Com a evolução da técnica de ultrassonografia, foi possível avançar muito no conhecimento sobre o comportamento das ondas foliculares e acompanhar o crescimento e a regressão de folículos durante o ciclo estral com maior precisão (PIERSON; GINTHER, 1984). Estudos têm demonstrado relação positiva entre a quantidade de folículos antrais recrutados, que emergem por onda folicular, e a fertilidade do rebanho bovino (IRELAND et al., 2008; EVANS et al., 2010; IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012, SANTOS et al. 2016). No entanto, apesar dos avanços, ainda permanecem muitas dúvidas quanto aos mecanismos fisiológicos envolvidos nessa relação, e os resultados em diferentes trabalhos são altamente controversos.

A fêmea bovina, ao nascer, apresenta em média 100.000 folículos primordiais nos ovários. Esses folículos compreendem um *pool* de reserva que será utilizado pelo animal ao longo de sua vida reprodutiva, e podem permanecer quiescentes ou iniciar o processo de crescimento chegando à ovulação. Assim, o número de folículos antrais de um animal depende da taxa de mobilização de folículos primordiais e da ação de fatores de crescimento e gonadotrofinas hipofisárias decorrentes do ciclo estral (CROWE, 1999).

Normalmente, o número de folículos antrais recrutados por onda, possui alta repetibilidade em um mesmo animal (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; 2008, SILVA-SANTOS et al., 2014, MOROTTI et al., 2015), independente do dia do ciclo estral, da quantidade de ondas de crescimento folicular por ciclo, da idade, do estágio de lactação ou da estação do ano (BURNS et al., 2005; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; MOSSA et al., 2010; MOSSA et al., 2012), permanecendo constante por 8 a 10 anos, quando inicia a depleção das reservas foliculares do ovário (IRELAND et al., 2007). Essa repetibilidade tem representado uma característica importante nos estudos da dinâmica folicular, uma vez que torna possível classificar fêmeas bovinas de acordo com o número de folículos (> 3 mm), dividindo-as em grupos de baixa, intermediária e alta CFA.

2.4.1 Causas da variabilidade na contagem de folículos antrais

São muitas as hipóteses que buscam explicar as causas para as diferenças na CFA entre diferentes raças e entre animais da mesma raça. Estudos mostram que a população de folículos antrais está positivamente correlacionada à reserva e função ovariana e, conseqüentemente, com a fertilidade de bovinos. Entretanto, ainda permanece pouco compreendida a influência dos fatores genéticos e ambientais na variabilidade da população folicular ovariana.

- Raça

Sabe-se que há uma grande diferença, quanto ao número de folículos antrais recrutados, entre fêmeas de diferentes raças, embora entre elas existam pequenas diferenças nas características dos ciclos estrais e das ondas foliculares (SARTORI et al., 2010). Fêmeas de raças zebuínas, como, por exemplo, Nelore, Brahman e Gir, podem apresentar o dobro de folículos por onda quando comparadas às fêmeas de raças taurinas, como Holandesas e Angus (BURATINI et al., 2000).

Bastos et al. (2010) relataram que fêmeas zebuínas da raça Nelore, apresentaram, em média, 43 folículos; e fêmeas taurinas da raça Holandesa, apenas 20. Em outro estudo, Carvalho et al. (2008) verificaram uma média de 34 e 26 folículos na emergência da onda em novilhas zebuínas e taurinas, respectivamente. Estudos anteriores relataram 50 folículos (por onda ou por ovário) em vacas zebuínas e 24 em vacas taurinas (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; BURATINI et al., 2000). A maior quantidade de folículos antrais em fêmeas zebuínas, principalmente em vacas Nelore, demonstrada nesses trabalhos tem relevante importância nas taxas de recuperação de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, justificando o maior potencial dessas raças em programas de reprodução assistida (SENEDA et al., 2000; PONTES et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2011). Entretanto, ainda não foi elucidado a origem dessa diferença entre as subespécies.

Silva-Santos et al. (2011) afirmaram que a superioridade dos animais zebuínos, em relação a PFA, não é consequência de maior reserva ovariana de folículos pré-antrais, conforme proposto por Ireland et al. (2008), e supõem que esta é comandada por mecanismos de controle de crescimento folicular desencadeados

após a fase pré-antral, como, por exemplo, a elevação na sensibilidade às gonadotrofinas no momento da emergência folicular (SARTORI; BARROS, 2011). Segundo Alvarez et al. (2000), a maior concentração de fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF1), nas fêmeas zebuínas em comparação às taurinas, também pode justificar a diferença no número de folículos entre as raças.

- Composição genética

Considerando que a variação na população folicular antral é determinada geneticamente, Favoreto (2015) avaliou o perfil global de expressão de genes de folículos antrais através da técnica do microarranjo em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) e da raça Angus (*Bos taurus*) de acordo com a CFA e diferenças na expressão gênica, através de estudos de associação genômica (Genome Wide Association Study - GWAS) com polimorfismos de base única (SNPs). GWAS permite identificar variações no DNA, sinalizando a localização de genes que estão correlacionados com a expressão da característica de interesse (KU et al., 2010). Seus resultados indicam que as novilhas Nelore têm um padrão diferente na expressão de genes envolvidos no recrutamento e desenvolvimento do folículo, o que justifica a maior população folicular nesses animais, e que os animais com maior população folicular apresentaram uma expressão aumentada de genes associados ao desenvolvimento celular e metabolismo. Favoreto (2015) sugere que os genes identificados podem ser usados como marcadores moleculares na seleção de animais submetidos à reprodução assistida.

Nesse sentido, diversos estudos analisam a hipótese de que a variabilidade na CFA na prole não seja influenciada unicamente pelo mérito genético, mas também pela idade da vaca, fase de lactação (vacas em lactação e novilhas não lactantes) e quantidade de produção de leite durante a gestação. Walsh et al. (2014) observaram que a CFA em bovinos da raça Holandesa é uma característica genética de baixa a moderada herdabilidade ($0,31 \pm 0,14$ e $0,25 \pm 0,13$ para vacas e novilhas, respectivamente), que fêmeas em lactação geraram bezerras com maior CFA ($19,2 \pm 0,6$) do que vacas secas ($15,9 \pm 1$; $P < 0,01$), e, ainda, que a população folicular foi negativamente associada com a concentração da gordura do leite. Os autores

concluíram que a CFA pode ser influenciada pela idade, fase de lactação e gordura do leite.

Em novilhas cruzadas *B. indicus* x *B. taurus*, da raça Braford, Morotti et al. (2015) verificaram que o número de folículos antrais pode ser influenciado pela precocidade de acabamento ao desmame, além do efeito paterno apresentar 17% de correlação entre o parâmetro genético e a contagem de folículos antrais. Todavia, encontraram baixíssima relação entre a quantidade de folículos e os principais parâmetros genotípicos e fenotípicos, entre eles: idade, ganho de peso e características de carcaça, utilizados em programas de seleção de matrizes. Concluíram que a utilização da CFA como ferramenta de seleção é seguro e não compromete o mérito genético da fêmea. Nesse mesmo estudo foi avaliada a repetibilidade da CFA, desde a puberdade até um ano, e observaram que a PFA variou de 3 a 64 folículos entre as fêmeas, mas foi altamente repetitivo (0,89-0,92) no mesmo animal. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; 2008, SILVA-SANTOS et al., 2014).

- Idade

Honaramooz et al. (2004) correlacionaram a quantidade de folículos com a idade do animal, e relataram um aumento significativo no número de folículos ≥ 3 mm de diâmetro em fêmeas de 6 a 60 semanas de idade. O mesmo foi constatado por Cushman et al. (2009), que verificaram um aumento no número de folículos antrais até os 5 anos de idade em vacas e novilhas de corte.

Em outro estudo, Oliveira Junior et al. (2015), avaliando a PFA de novilhas e vacas entre 12 e 60 meses, de duas raças (Nelore e Girolando), observaram que novilhas das duas raças tiveram menor PFA (16,2 e 18,1 folículos, respectivamente) quando comparadas às vacas das mesmas raças (30,9 e 26,7 folículos). Esses mesmos autores não encontraram diferenças na PFA entre as raças, talvez por apresentarem grande proximidade genética, e concluíram que a PFA pode ser influenciada pela idade. Em animais da raça Holandesa, Martinez et al. (2016) também notaram associação positiva entre população folicular e a idade. Entretanto, estudos com bovinos Braford, mostraram número de folículos semelhantes ao

desmame e um ano (SILVA-SANTOS et al., 2014), bem como em vacas e novilhas Holandesas (BURNS et al., 2005).

- Nutrição e a saúde materna

Existem indicativos de que as condições nutricionais da mãe podem influenciar a quantidade de folículos primordiais formados durante a vida fetal e, conseqüentemente, o tamanho da reserva folicular e posterior potencial reprodutivo da prole. Mossa et al. (2009) mostraram que o número de folículos antrais > 3 mm foram 50% menores nas proles das fêmeas que passaram por restrição alimentar durante os três primeiros meses de gestação, em comparação com as bezerras nascidas das vacas que não foram submetidas à restrição.

Infecções crônicas em vacas leiteiras gestantes também diminuem o tamanho da reserva ovariana. Animais com elevada contagem de células somáticas no leite (> 200.000) produziram filhas com baixa concentração de hormônio anti-Mülleriano – AMH (IRELAND et al., 2011; EVANS et al., 2012). O AMH é uma glicoproteína produzida exclusivamente por células da granulosa de folículos saudáveis em crescimento e expresso apenas nos ovários (VIGIER et al., 1984). Sua concentração está altamente correlacionada com PFA e o tamanho da reserva ovariana em bovinos e outras espécies (IRELAND et al., 2007 e 2010). De acordo com Lavon et al. (2011), doenças como mastite e metrite podem modificar a função ovariana e o crescimento folicular, podendo até interromper a atividade cíclica.

2.5 INFLUÊNCIAS DA CFA NA FERTILIDADE DA ESPÉCIE BOVINA

Independente da causa/origem de variação da PFA, sabe-se que a quantidade de folículos antrais está relacionada com o potencial reprodutivo e que pode influenciar, direta e indiretamente, índices zootécnicos de fertilidade, tais como o intervalo entre partos e taxa de prenhez (MOSSA et al., 2012), e o desempenho do animal mediante utilização de diferentes biotécnicas da reprodução (principalmente taxa de recuperação de oócitos e produção de embriões).

A quantidade de folículos antrais ovarianos tem sido fortemente relacionada a importantes características, tais como: tamanho do ovário e do aparelho

reprodutor, concentração de hormônios, resposta à superovulação, qualidade de oócito, ambiente folicular, produção de embriões, taxa de prenhez, e outros (IRELAND et al., 2007; EVANS et al., 2010; IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012, SANTOS et al., 2016).

A maioria dos estudos norte-americanos e europeus estabelece que há relação entre o alto número de folículos antrais e desempenho reprodutivo. Fêmeas taurinas, da raça Holandesa, com alta CFA, são classificadas como superiores; e aquelas com baixa CFA são consideradas menos férteis (MOROTTI et al., 2017).

No Brasil, algumas pesquisas realizadas com animais zebuínos também mostraram que vacas com maior número de folículos antrais apresentam melhores índices de eficiência reprodutiva, principalmente com relação a produção de embriões *in vitro* (PONTES et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016). Entretanto, outros estudos mostraram que animais zebuínos e cruzados podem apresentar comportamento diferente do padrão descrito para animais taurinos, e que a baixa CFA não é obrigatoriamente indicativo de menor desempenho reprodutivo (SANTOS et al., 2013; MOROTTI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; SANTOS et al., 2016; MORAES, 2016; MORETTI, 2016). Portanto, a CFA deve ser utilizada em conjunto com outras ferramentas na seleção de fêmeas com maior potencial reprodutivo no rebanho (MORETTI, 2016).

Os dados divergentes reforçam ainda que é de relevante importância, ao estabelecer uma comparação entre os estudos norte-americanos, europeus e brasileiros, considerar as diferenças de rebanho e de sistemas de produção, tais como: subespécies (*B. indicus* x *B. taurus*), aptidão de produção (leite ou corte), idade da fêmea, variabilidade da CFA entre indivíduos, critério de classificação dos grupos experimentais em relação a quantidade de folículos antrais, práticas de manejo, fatores ambientais (MOROTTI et al., 2015) e a biotecnologia da reprodução utilizada.

2.5.1 Tamanho do ovário e do aparelho reprodutor

Dentre os parâmetros de fertilidade que podem associar-se à população de folículos antrais, vêm sendo investigadas características morfométricas do aparelho reprodutor da fêmea. Segundo Eborn et al. (2013), fêmeas de baixa CFA

possuem ovário 40% menor ($3,05 + 0,33$ g) quando comparadas com fêmeas de alta CFA ($7,11 + 0,41$ g), relacionando o tamanho do ovário à baixa fertilidade desses animais. Esses resultados estão de acordo com Ireland et al. (2008), que também observaram menores ovários em fêmeas com menor população folicular

Mesquita et al. (2016) avaliaram o comprimento e a largura da rima vulvar (fenda ente os lábios vulvares), diâmetros do colo do útero, corno uterino e oviduto, em vacas da raça Tabapuã. As medidas genitais internas não apresentaram relação com a quantidade de folículos. No entanto, fêmeas com maior CFA apresentaram maiores comprimento ($18,96 \pm 1,97$ cm) e largura ($20,08 \pm 1,36$ cm) de rima vulvar do que vacas com menor CFA ($14,76 \pm 1,51$ e $11,16 \pm 1,60$ cm, respectivamente). Os autores concluem que as medidas genitais externas podem ser correlacionadas com a PFA, mas destacam a importância de considerar sua relação com o tamanho corporal da vaca, podendo ser uma ferramenta útil e relativamente viável para seleção de vacas com maior quantidade de folículos em condições de campo.

2.5.2 Concentração de hormônios

A maior fertilidade em animais com alta CFA pode ainda estar associada a diferentes perfis hormonais e expressão de genes reguladores do recrutamento folicular (IRELAND et al., 2007; IRELAND et al., 2009; MOSSA et al., 2010).

A concentração de progesterona tem uma positiva relação com a função uterina e o desenvolvimento embrionário (DISKIN; MORRIS, 2008); portanto, baixas concentrações plasmáticas deste esteroide, em bovinos, estão associadas a altas taxas de mortalidade embrionária (STRONGE et al., 2005), baixos índices de prenhez e menor quantidade e qualidade de oócitos, refletindo em menor fertilidade em animais de baixa CFA (EVANS et al., 2012).

Jimenez-Krassel et al. (2009) verificaram, em animais taurinos, níveis circulantes de progesterona, durante o ciclo estral, cerca de 30 a 50% menores em fêmeas com menor quantidade de folículos antrais. Os autores atribuíram a reduzida capacidade de síntese de progesterona a uma diminuição da função do CL, da

luteinização das células da granulosa do folículo dominante e da espessura endometrial entre os dias 0 e 6 do ciclo estral.

Vacas Holandesas apresentaram o mesmo padrão de comportamento quanto às concentrações de progesterona. Durante o diestro, foram maiores nos animais com alta contagem folicular ($7,6 \pm 0,3$ ng/mL) do que naqueles com baixa ($6,5 \pm 0,3$ ng/mL), independente se estavam gestantes ou não (MARTINEZ et al., 2016).

Ao comparar animais de diferentes raças, fêmeas *Bos taurus* tiveram menores concentrações circulantes de hormônios esteroides. Segundo Sartori et al. (2016), vacas Holandesas apresentam, no dia 7 do ciclo estral, uma menor concentração de progesterona circulante (1,9 ng/mL) do que vacas Nelores (vs. 2,7 ng/mL), podendo justificar a superioridade dos animais zebuínos quanto ao número de folículos recrutados.

Animais de baixa CFA também apresentaram elevados níveis de FSH e LH (IRELAND et al., 2007). Segundo Ireland et al. (2009), elevados níveis de FSH podem ser deletérios para os oócitos, pois aumentam o número de receptores para estrógeno nas células dos cúmulos e, conseqüentemente, a concentração de estradiol intrafolicular, levando a uma diminuição da maturação oocitária e do desenvolvimento folicular. De acordo com Malhi et al. (2005), animais com menores números de folículos recrutados por ciclo estral também apresentaram maior concentração de FSH circulante.

Mais recentemente, objetivando determinar a relação dos hormônios andrógenos e a população de folículos antrais, pesquisadores avaliaram a concentração plasmática e intrafolicular de testosterona e a expressão de genes de enzimas produtoras desse hormônio em folículos antrais de novilhas Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), com baixa e alta contagem de folículos ovarianos.

De acordo com Loureiro et al. (2016), andrógenos estão positivamente relacionados com o número de folículos antrais, além de aumentarem a expressão de fatores de crescimento em células da granulosa e em oócitos. Nesse trabalho verificou-se que as novilhas Nelore possuem mais folículos antrais que as novilhas Angus. Os autores também observaram que a concentração de testosterona foi maior nas novilhas Angus, podendo esse resultado estar associado ao aumento da expressão de mRNA de CYP11A1. Nas novilhas Nelore, houve maior expressão dos

genes da enzima produtora de androgênio. Dessa maneira, sugere-se que a testosterona estaria agindo, através de diferentes mecanismos, para aumentar o desenvolvimento folicular em animais Nelore e melhorar a fertilidade em novilhas Angus.

Um possível aumento na fertilidade de animais de alta CFA também pode estar associado à produção do hormônio anti-Mülleriano (AMH). As concentrações plasmáticas do AMH têm apresentado relação com o número de folículos antrais e de oócitos saudáveis, sendo considerado um bom marcador endócrino do tamanho da reserva ovariana e do *pool* de folículos em crescimento (IRELAND et al. 2008; RICO et al., 2011, BARUSELLI et al., 2015). A produção desse hormônio nas fêmeas é realizada pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais e dos pequenos folículos antrais em crescimento (DURLINGER et al., 1999; RICO et al., 2011), aparecendo em alta concentração no início do crescimento da onda. No ovário, esse hormônio também promove uma redução na expressão do mRNA do receptor de FSH, diminuindo a capacidade de resposta do folículo ao FSH e inibindo o recrutamento de folículos primordiais (DURLINGER et al., 1999).

Ireland et al. (2008) verificaram que a concentração média do hormônio anti-Mülleriano, no período anterior à ovulação, foi de 2 a 6 vezes maiores em fêmeas taurinas com alta CFA. Posteriormente, Batista et al. (2014) também relataram níveis de AMH superiores em fêmeas com maior quantidade de folículos, independentemente das raças, taurinas ou zebuínas. Esses resultados significam que altos níveis de AMH coincidem com o maior número de folículos em crescimento, sendo um bom indicativo de fertilidade.

Problemas na saúde materna durante a gestação também pode, além de comprometer o tamanho da reserva folicular ovariana, reduzir os níveis AMH na prole. Ireland et al. (2011) e Evans et al. (2012) constataram que bezerras nascidas de vacas com alta contagem de células somáticas no leite apresentaram níveis reduzidos de AMH quando comparadas com as filhas de vacas com baixa contagem de células somáticas.

O perfil plasmático de AMH também pode ser utilizado como parâmetro de resposta ovariana ao tratamento de superovulação e estar associado à produção de embriões, caracterizando-se como uma excelente ferramenta para seleção de fêmeas com melhor fertilidade e com maior potencial para aplicação das

biotécnicas da reprodução (IRELAND et al., 2011; RICO et al., 2012, BARUSELLI et al., 2015).

2.5.3 Qualidade de oócito

Existem evidências crescentes de que a qualidade do oócito e a aquisição de competência para fecundação são fatores fundamentais para a fertilidade da fêmea, refletindo diretamente na taxa de desenvolvimento embrionário, no índice de prenhez (LONERGAN et al., 2001) e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo do rebanho.

Sabe-se que a qualidade oocitária e seu potencial de desenvolvimento podem ser influenciados pelas condições fisiológicas da fêmea (MESQUITA et al., 2016), estado nutricional (SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008) e fase do desenvolvimento folicular (LONERGAN; FAIR, 2008). Nesse contexto, o ambiente folicular é de relevante importância, visto que concentrações séricas de FSH, estradiol, AMH e progesterona podem alterar o número de oócitos morfológicamente saudáveis, afetando diretamente sua qualidade (IRELAND et al., 2007; EVANS et al., 2012).

Alguns parâmetros podem ser analisados para prever a qualidade do oócito, tais como: aparência morfológica do complexo-cumulus-oócito (HAWK; WALL, 1994), a avaliação do estágio nuclear (HOSOE; SHIOYA, 1997), o conteúdo lipídico (Leroy et al., 2005), genes transcritos (BURNS et al., 2005) e a presença de apoptose (IRELAND et al., 2009). Todavia, os mais expressivos são os índices de desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* (IRELAND et al., 2011; RICO et al., 2012; SILVA-SANTOS et al., 2014; BARUSELLI et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Resultados de pesquisas que relacionam a variação da população folicular, qualidade de oócito e problemas de fertilidade reduzida são muito escassos.

Ireland et al. (2007) determinaram as diferenças nas concentrações séricas de FSH, estradiol e número de oócitos morfológicamente saudáveis, de acordo com a PFA. Observaram que animais de baixa CFA apresentaram maiores níveis de FSH e um número quatro vezes menor de oócitos saudáveis em relação às vacas de alta CFA. Ireland et al. (2008) também associaram alta PFA (≥ 25 folículos) e baixa

PFA (≤ 15) com as concentrações de AMH em animais com idade entre 12 a 18 meses. Esse estudo mostrou que os níveis plasmáticos desse hormônio estão positivamente correlacionados com qualidade de oócitos, e que fêmeas de alta CFA apresentaram 80% a mais de folículos saudáveis e maiores níveis de AMH do que as fêmeas com baixa CFA.

Posteriormente, os mesmos pesquisadores analisaram mecanismos pelos quais as altas variações da PFA podem interferir na função ovariana e na qualidade do oócito (IRELAND et al., 2009). Avaliaram a produção de FSH e estradiol intrafolicular e observaram que fêmeas com menor população folicular apresentaram concentração de estradiol duas vezes menor, podendo ter impacto direto na qualidade do oócito desse grupo de animais. Além disso, avaliando biomarcadores de diferenciação, constataram que animais com baixa PFA apresentam maior expressão de mRNA da enzima catepsina nas células do cumulus, o que significa a presença de mais marcadores relacionadas a apoptose celular, indicativos de baixa qualidade.

Conforme já citado, baixas concentrações plasmáticas de progesterona também estão relacionadas a menor quantidade e qualidade de oócitos (EVANS et al., 2012).

2.6 INFLUÊNCIAS DA CFA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

A influência da PFA na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões tem sido amplamente relatada. Sabe-se que o tamanho da PFA reflete principalmente na quantidade de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (IRELAND et al., 2007; PONTES et al., 2011, EVANS et al., 2012; SILVA-SANTOS et al., 2014, SANTOS et al., 2016), sendo uma característica muito utilizada na seleção de potenciais doadoras nos programas comerciais de produção de embriões. Apesar da aparente vantagem quantitativa de fêmeas com maior quantidade de folículos, ainda não se sabe o impacto desse critério de seleção sobre outras características genéticas de interesse, sendo necessário cautela ao selecionar animais apenas considerando a CFA (MOROTTI et al., 2015).

Com o objetivo de avaliar a produção embrionária de acordo com a PFA, Ireland et al., (2007) conduziram um estudo com produção *in vivo*, por

superovulação (SOV), e *in vitro* (PIVE) de embriões. Observaram que novilhas de corte *Bos taurus* superovuladas, com alta CFA (≥ 25), produziram maior número de embriões *in vivo*, totais e transferíveis (10,6 e 5,4 embriões/doadora, respectivamente), do que aquelas com baixa CFA (≤ 15 ; 4,7 e 3,8 embriões/doadora). No entanto, a porcentagem de embriões viáveis *in vivo* foi menor para o grupo de alta CFA (50,7%), quando comparado com o grupo de baixa CFA (79,8%). Na produção *in vitro*, a partir de ovários de vacas *Bos taurus* provenientes de abate comercial em frigoríficos, não houve influência da CFA na taxa de embriões produzidos (29,6% baixa CFA vs. 30,9% alta CFA) e na taxa de eclosão (14,0% baixa CFA vs. 14,8% alta CFA).

Ao contrário, Pontes et al. (2011) observaram maior quantidade de embriões *in vitro* e de prenhez, para vacas *Bos indicus*, (entre 31-52 meses), da raça Nelore com elevada produção de oócitos (59 oócitos\OPU), em comparação com o grupo de baixa produção de oócitos (10 oócitos\OPU). Tendo em vista que as diferenças na fisiologia dos animais *Bos taurus* e *Bos indicus* devem ser levadas em consideração no emprego das biotécnicas reprodutivas, é compreensível haver relatos com resultados distintos. Assim como Pontes et al. (2011), outros trabalhos também demonstraram a superioridade de animais *B. indicus* e mestiços *B. indicus* x *B. taurus* com alta CFA, em relação a produção de embriões.

Silva-Santos et al. (2014), comprovaram a existência de relação entre alta contagem folicular e quantidade de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* em fêmeas mestiças *B. indicus* x *B. taurus*, da raça Braford, aos 24 meses. Os mesmos animais foram submetidos às técnicas de PIVE e superovulação (SOV). Em animais com alta CFA (≥ 40 folículos), o número de oócitos viáveis foi superior em comparação com o grupo de baixa (≤ 10 folículos; 21,6 vs 3,2); no entanto, não houve diferença na porcentagem de oócitos viáveis entre os grupos alta e baixa CFA (58,9% vs. 55,2%, respectivamente). Na PIVE, houve maior número de embriões totais produzidos nas fêmeas com mais folículos (6,10 embriões/doadora vs. 0,55 embriões/doadora). O mesmo foi observado para o número médio de embriões coletados na SOV: 6,95 embriões/coleta no grupo de alta CFA e 1,9 no grupo de baixa, reforçando a vantagem quantitativa de fêmeas com maior população de folículos. Embora haja diferenças em números de embriões produzidos, não se observou, entre os grupos, diferença nas taxas de clivagem (61,25 vs. 56,03) e nas porcentagens de blastocisto produzido *in vitro* (16,53% alta vs. 9,48% baixa). Os autores concluem que o número de folículos

antrais presentes nos ovários pode prever, de forma confiável, o sucesso da PIV e a resposta superovulatória em bovinos.

Recentemente, Santos et al. (2016) compararam as taxas de produção *in vitro* de vacas Nelore, *Bos indicus*, com base na produção de oócitos da doadora, e verificaram melhores resultados no grupo de alta CFA. Os animais foram classificados em alta (≥ 40), média (18-25) e baixa (≤ 7) quantidade de oócitos recuperados a partir de folículos ≤ 3 mm de diâmetro. Os autores observaram taxa de blastocisto de 41,9% para o grupo de alta, 32,4% para o grupo de média e 13,0% para o de baixa, e atribuíram as diferenças de resultados, em comparação com estudos anteriores, à composição genética dos animais.

No entanto, Rosa (2015), utilizando ovários de matadouro de vacas Nelore, divididos em grupos de alta CFA (> 92 folículos), intermediária (46 a 76 folículos) e baixa (< 31 folículos), não observou, entre os grupos, diferenças nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os divergentes resultados encontrados entre os autores podem ser devido às diferenças de metodologias empregadas, como classificações de grupos amostrais, técnicas de recuperação de oócito, origem genética dos animais e técnica de produção de embrião.

2.7 INFLUÊNCIAS DA CFA NA TAXA DE PRENHEZ

Para testar a hipótese de que a CFA está associada com a fertilidade em bovinos, muitos trabalhos avaliaram a taxa de prenhez, índice de fundamental importância na gestão da eficiência reprodutiva em rebanhos. Estudos com novilhas mestiças e aptidão para produção de carne, submetidas à IA e repasse com touro aos 60 dias, mostraram melhores taxas de concepção (94,3% vs. 85,5%) para os animais com mais folículos antrais (CUSHMAN et al., 2009).

Mossa et al. (2012) encontraram resultados semelhantes para animais taurinos com aptidão para leite, e associaram esses resultados a diferentes perfis hormonais e expressão de genes envolvidos no crescimento e recrutamento folicular. Fêmeas Holandesas com alta CFA (≥ 25 folículos), quando comparadas com fêmeas com baixa CFA (≤ 15 folículos), tiveram melhores resultados de prenhez na

primeira Inseminação Artificial (94% vs. 84%), menor intervalo do parto à concepção (100 vs. 114 dias) e menor número de inseminações por prenhez (2,4 vs. 2,7).

Martinez et al. (2013), ao avaliarem animais *Bos taurus*, das raças Holandesa e Jersey, em relação à população folicular, obtiveram 66% de concepção à primeira IA para fêmeas com alta CFA (> 30 folículos), enquanto que aquelas com baixa CFA (< 20 folículos) tiveram apenas 45%. As fêmeas com mais folículos também apresentaram maiores taxas de nascimento de bezerros (79,9% vs 64%). Em estudo recente, Martinez et al. (2016) também verificaram que vacas com alta CFA, quando comparadas com vacas com baixa CFA, apresentam melhores parâmetros de fertilidade, como intervalo do parto à concepção ($82,4 \pm 1,6$ vs. $87,3 \pm 1,2$ dias, respectivamente), e taxa de prenhez na primeira IA (68,1% vs. 45,3%). Esses autores confirmaram que vacas Holandesas com maior número de folículos (iguais ou maiores do que 2 mm), são mais férteis.

No entanto, avaliando animais *Bos indicus*, Santos et al. (2013 e 2016) não encontraram influência da população folicular sobre a taxa de concepção à IATF, em vacas Nelores com alta CFA (51,9% de prenhez), média (48,6%) e baixa (58,6%). Os mesmos resultados foram obtidos por Morotti et al. (2014), Pinheiro et al. (2015), Rodrigues et al. (2015) e Moraes (2016), que verificaram que a população de folículos antrais não influenciou as taxas de prenhez na IATF em vacas dessa raça.

Moretti (2016) analisou fêmeas Nelore de alta CFA (≥ 45 folículos, $n = 144$), intermediária (≥ 20 e ≤ 40 folículos, $n = 295$) e baixa CFA (≤ 15 folículos, $n = 165$) e observou que vacas de baixa CFA apresentam taxas de concepção, aos 30 dias após IATF, superiores (67,1%), quando comparadas aos grupos intermediário (54,2%) e de alta (49,3%). Entretanto, a taxa de prenhez final, com repasse de touro, não diferiu entre os grupos. Esses resultados são contrários aos estudos com animais taurinos e revelam que, para taxa de concepção na IATF, a baixa CFA não é obrigatoriamente indicativo de menor desempenho reprodutivo.

Ao contrário, Pontes et al. (2011) observaram que a quantidade de oócitos recuperados por OPU está positivamente relacionada com a taxa de prenhez, para embriões produzidos *in vitro*. Doadoras da raça Nelore com elevada produção de oócitos (59 oócitos / OPU), apresentaram taxa de prenhez seis vezes maiores em comparação com fêmeas de baixa produção (10 oócitos / OPU). Entretanto, é importante ressaltar que as taxas de prenhez nesse estudo foram obtidas a partir de

embriões fecundados *in vitro*, enquanto que nos trabalhos citados anteriormente, os embriões foram fertilizados *in vivo*, por IATF, processo em que as matrizes são submetidas a um protocolo hormonal para sincronização de cio.

REFERÊNCIAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Rebanho Bovino Brasileiro**. 2015. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 05 dez. 2016.
- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Perfil da pecuária no Brasil: relatório anual 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.newsprime.com.br/img/upload2/2016_FolderPerfil_PT.pdf>. Acesso em: 10 set. 2016.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; **GINTHER**, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.177-88, 1992.
- ALVAREZ P.; SPICER L.J.; CHASE C.C. JR., PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim Sci.**, v.78, p.291-303, 2000.
- AUSTIN, C. R.; SHORT, R.V. **Reproduction in mammals 1: germ cells and fertilization**. 2.ed. New York: Cambridge, 1982. 177p.
- BARNETT K, R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.13, p.119, 2006.
- BARROS, C.M.; ERENO, E.R., MACHADO, M.F.; BURATINI, J.; PEGORER, M.F.; SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A. Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. **Reprod Fertil Dev**, v.21, n.1, p.1, 2008.
- BARUSELLI, P.S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SOUZA, A.H. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.487-97, 2015.
- BASTOS, M.; MATTOS, M.; MESCHIATTI, M.; SURJUS, R.; GUARDIEIRO, M.; FERREIRA, J. et al. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. **Acta Scientiae Veterinariae.**, v.38, p.776, 2010.
- BATISTA, E.O.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.; SA FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.; RENNÓ, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.448-52, 2014.
- BLONDIN, P. Status da produção de embriões no mundo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 29., 2015, Gramado. **Anais...** Gramado: SBTE, 2015, p. 445.

- BORGES, Á.M. et al. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arq. Bras. Med. Veterinário. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 595-604, Out. 2001.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.1, p. 513, 2006.
- BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N.B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.2-20, 2004.
- BURATINI, J. JR. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**. United States, v.54, p.421-31, 2000.
- BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.; 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. **Biol Reprod**. United States, v.73, p.54-62, 2005.
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**. United States, v.69, p.167-75, 2008.
- CHAVES, R.N. et al. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010.
- CROWE, M.A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in cattle. **Reproduction Domestic Animals**, v.34, n.3, p.157-166, 1999.
- 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.1971–1980, 2009.
- DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.260-267, 2008.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.
- DROST, D.V.M.M. **Training Manual For Embryo Transfer in Cattle**, Flórida: College of Veterinary Medicine, University of Flórida, 1995, 59p.
- DURLINGER, A.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMME, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, p.5789-5796, 1999.

EBORN, D.R.; CUSHMAN, R.A.; ECHTERNKAMP, S.E. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. **J Anim Sci**, v.91, p.4168–4179, 2013.

EVANS, A.C.; MOSSA, F.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; BUTLER, S.T.; ZIELAK-STECIWKO, A.E.; SMITH, G.W.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; IRELAND, J.J. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, Colchester, v.67, n.1, p.421-429, 2010.

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 offspring. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.31-37, 2012.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.203-216, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.

FAVORETO, M.G. **Estudo de associação genômica e perfil de expressão gênica de folículos antrais em novilhas das raças Nelore e Angus, associadas ao fenótipo de alta e baixa população folicular**. 2015. 88f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2015.

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.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol Reprod**, v.65, n.3, p.648-54, Set. 2001.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.83, n.82, p.109-126, 2004.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225-32, 1994.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23 p.23-31, 2011.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.431-46, 2004.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci.**, v.78, p.239-57, 2003.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v.87, n.1, p. 223-30, Set. 1989.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L.J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **J. Exp. Zool.**, v.253, p.71-82, 1990.

HAPER, M.J.K. **Gamete and zygote transport**. In: KNOBIL, E.; NEILL, D.J. The physiology of reproduction. 2. Ed. New York: Raven press, 1994. v.1, p.123-187.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v.41, p.1571-1583, 1994.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol**, v.124, p.43-101, 1991.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.80, n.1-2, p.15-29, jan. 2004.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocyte classified by cumulus complex. **Zigote**, v.5, p.371-376, 1997.

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

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa pecuária Municipal**. 2015. Disponível em:
<<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

IRELAND, J. J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a

diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p.1-14, 2010.

IRELAND, J.J.; ZIELAK-STECIWKO, A.E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P.G.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biol Reprod.**, v.80, p.954-64, 2009.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. 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-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, n.1, p.1-14, 2011.

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. **Biol Reprod.**, v.79, p.1219-25, 2008.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fertil.**, v.34, p.39-54, 1987.

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. **Hum Reprod**, v.22, p.1687–1695, 2007.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C.; 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, n. 6, p.1272-1281, jun. 2009.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H. J.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

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

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613, 2002.

KU, C.S.; LOY, E.Y The pursuit of genome-wide association studies: where are we now? **Journal of Human Genetics**, v.55, p.195-206, 2010.

LAVON, Y. et al. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v.40, p.98-109, 2011.

LEROY, J.L.M.R.; BOLS, P.E.J.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Aspiração de oócitos (ovum pick-up), a técnica ideal para o estudo do ambiente intra-folicular e da qualidade oocitária em vacas de leite de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.5-18, 2005.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biol Reprod**, v.63, n.3, p.839-45, 2000.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v.64, p.171-178, 2001.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v.41, p. 427-37, 2001.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In-vitro produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LOUREIRO, B.; ERENO, R.L.; FAVORETO, M.G.; BARROS, C.M. Expression of androgen-producing enzyme genes and testosterone concentration in Angus and Nellore heifers with high and low ovarian follicle count. **Theriogenology**, v.86, p.523–527, 2016.

LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.41, n.1, p.61-69, 2001.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biol Reprod.**, v.73, p.45-53, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil está apto a exportar embriões bovinos *in vitro* para o Paraguai**. Notícia, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2016/08/brasil-esta-pto-a-exportar-embrioes-bovinos-in-vitro-para-o-paraguai>. Acesso em: 11 ago 2016.

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

MARTINEZ, M.F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B.; JUENGEL, J.L. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, v.85, p.466- 75, 2016.

MAYER, L.P. et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, n.1, p.130-138, Jul. 2004.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v.66, p.180–184, 2002.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, n.55, p.911-922, 2001.

MESQUITA, N.F.; MACULAN, R.; MACIEL, L.F.; ALVES, N.; DE CARVALHO, R.R.; MOREIRA, G.M.; DE SOUZA, J.C. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **J Reprod Dev.**, v.62, n.6, p.587-590, 2016.

MIRANDA, J.E.C.; FREITAS, A.F. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. Embrapa Gado de Leite, **Circular técnica** 98, 12p. Juiz de Fora. 2009.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. In MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. (ed.), *Embriologia Clínica*, 480p., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.13-38, 1994.

MORAES, F.L.Z. **Influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo**. 2016. 44f. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes: Produção animal) - Universidade do Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2016.

MORETTI, R. **Influência da contagem de folículos antrais sobre as taxas de concepção e prenhez em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à sincronização da ovulação**. 2016. 28f. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes: Produção animal) - Universidade do Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2016.

MOROTTI, F.; SANTOS, G.M.G.; JÚNIOR, C.K.; SILVA-SANTOS, K.C.; ROSO, V.M.; SENEDA, M.M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. **Theriogenology**, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.025. 2017.

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, 2015.

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, 2014.

MOSSA, F. et al. Inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v.22, p.550-7, 2010.

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 follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows
Journal of Dairy Science, v.95, p.2355–2361, 2012.

MOSSA, F.; KENNY, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SMITH, G.W.; BERRY, D.; BUTLER, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. Undernutrition of Heifers during the First Trimester of Pregnancy Diminishes Size of the Ovarian Reserve in Female Offspring. 42nd **Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction**, v.135, p.77. 2009.

MURPHY, M.G., ENRIGHT, W.J., CROWE, M. A., MCCONNELL, K., SPICER, L.J., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.92, p.333-338, 1991.

NANZER, T.A.D.T. **Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução**. 2010. Disponível em: <
<http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/tecnico,39>>

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.418, 2010.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.s17-s20, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR et al. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3741-3750, nov./dez. 2015.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495–504, 1984.

PINHEIRO, V.G.; ERENO, R.L.; RAZZA, E.M.; BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F. Is the low number of ovarian antral follicles ≥ 3 mm in diameter associated with low fertility in lactating nelore cows? **Reproduction, Fertility and Development**, v.27, n.1, p.99-100, 2015.

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

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

RICO, C.; MEDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONTOUX, M.; CLEMENT, F.; et al. Regulation of antiMullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biol Reprod.**, v.84, p.560-71, 2011.

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.932-44, 2012.

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

ROSA, C. O. **Comparação da produção *in vitro* de embriões entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) de alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais.** 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

SALHA, O.; ABUSHEIKHA, N.; SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. **Hum Reprod Update**, v.4, p.816-32, 1998.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88–97, 2008.

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.; BLASCHIB, 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.

SARTORELLI, E.S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-94, 2005.

SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, J.R., MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v.86, p.32-40, 2016.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J Dairy Sci**, v.87, p.905-20, 2004.

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

SARTORI, R.; BASTOS, M.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.; ERENO, R.; BARROS, C. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v.67, n.7, p.357-75, 2010.

- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14, 2000. Stockholm. **Anais...** Stockholm: Proceedings Sweden, 2000. p.62-65.
- SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JUNIOR, 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 Animal**, v.49, p.228–232, 2014.
- SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; STERZA, F.A.M.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol Reprod**, v.39, p.308-317, 1988.
- STOJSIN-CARTER, A.; MAHBOUBI, K.; COSTA, N.N.; GILLIS, D.J.; CARTER, T.F.; NEAL, M.S.; MIRANDA, M.S.; OHASHI, O.M.; FAVETTA, L.A.; KING, W.A. Systemic and local anti-Müllerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Anim Reprod Sci.**, v.167, p.51-8, 2016.
- STRONGE, A.J.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, n.5, p.1212-1224, 2005.
- TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, n.5, p.777-782, 2001.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Informações sobre produção, exportações, importações e consumo de produtos agropecuários em 2014**. [banco de dados] 2015. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/>> . Acesso em: 07 dez 2016.
- VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E.E.; BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Hum Reprod Update**, v.6, n.5, p.457-74, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Anim. Reprod.**, v.9, n.1, 2012.
- VIGIER, B.; PICARD, J.Y.; TRAN, D.; LEGEAI, L.; JOSSO, N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertori and granulosa cells. **Endocrinology**, v.114, p.1315-1320, 1984.

WALSH, S.W.; MOSSA, F.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; TEMPELMAN, R.J.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.; 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.

3 HIPÓTESES

A alta contagem de folículos antrais ovarianos aumenta a produção *in vitro* de embriões das raças Nelore (*Bos indicus*) e Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*).

Fêmeas bovinas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*), com alta contagem de folículos antrais, apresentam maior produção *in vitro* de embriões.

Embriões *in vitro* de fêmeas da raça Girolando, com alta contagem de folículos antrais, proporcionam melhores índices de prenhez nas receptoras.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência da contagem de folículos antrais ovarianos sobre a produção *in vitro* de embriões, e a taxa de prenhez das receptoras destes embriões.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as taxas de clivagem e de produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), com alta e baixa contagem de folículos antrais ovarianos, no sétimo e décimo dia de desenvolvimento.

Comparar as taxas de produção *in vitro* de embriões de vacas da raça Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*), com alta e baixa contagem de folículos antrais ovarianos, no sétimo dia de desenvolvimento, e a taxa de prenhez das receptoras destes embriões.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 01: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE

Sheila Merlo Garcia¹; Paula Alvares Lunardelli²; Aline de Oliveira Santos¹, Claudia Maria Bertan Membrive³, Caliê Castilho¹, Raquel Zaneti Puelker⁴, José Otávio Folino Silva⁵, Marcelo Marcondes Seneda².

Resumo: O desenvolvimento de alternativas para otimizar a produtividade do rebanho é o desafio atual dos pesquisadores. Muitos estudos demonstram relação positiva entre a contagem de folículos antrais (CFA) e parâmetros de fertilidade do rebanho bovino e apontam essa característica como uma importante e confiável ferramenta, que poderia tornar a seleção de doadoras com alto potencial de produção de embriões *in vitro* (PIVE) mais eficiente. No entanto, trabalhos têm apresentado resultados controversos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) com alta e baixa CFA. Fêmeas com idade entre 24 e 36 meses, foram classificadas como vacas de alta CFA (entre 23-40 folículos, n = 8), e vacas de baixa CFA (entre 6-12 folículos, n = 8). Todos os animais, foram previamente sincronizados; cinco dias depois submetidos à OPU, e os oócitos recuperados enviados para PIVE. A produção de embriões foi avaliada no terceiro dia após a inseminação, para se determinar as taxas de clivagem e no sétimo e décimo dia, para se avaliar as taxas de blastocisto. Os dados obtidos foram considerados não paramétricos e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, com nível de significância de 1% e as porcentagens pelo teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Foram aspirados 1445 oócitos de vacas de alta CFA e 381 oócitos de vacas de baixa CFA. O grupo de alta CFA, comparativamente ao grupo de baixa CFA, obteve maiores médias de oócitos aspirados/OPU ($30,1 \pm 14,9$ vs. $7,9 \pm 3,8$; $p < 0,01$); oócitos cultivados/OPU ($24,6 \pm 12,3$ vs. $5,9 \pm 2,8$; $p < 0,01$); embrião clivado/OPU ($19,8 \pm 9,7$ vs. $4,46 \pm 2,37$); blastocistos no D7/OPU ($9,7 \pm 6,4$ vs. $1,5 \pm 1,6$; $p < 0,01$); e blastocistos no D10/OPU ($10,3 \pm 6,5$ vs. $1,7 \pm 1,8$; $p < 0,01$). A porcentagem de clivagem em relação aos oócitos cultivados não foi diferente entre os dois grupos (80,4% vs. 75,6%; $p < 0,01$) e as porcentagens de blastocistos no D7 e no D10 em relação aos oócitos cultivados, do grupo com alta CFA (39,8% e 41,8%, $p < 0,01$), foram superiores ao grupo com baixa CFA (26,1% e 29,0%, $p < 0,01$). Portanto, foi possível concluir que animais da raça Nelore com maior CFA apresentam melhores taxas de PIVE.

Palavras Chave: *Bos indicus*. Oócito. PIVE. Fertilidade. CFA.

Abstract: Developing alternative strategies to optimize the productivity of livestock is researchers' current challenge. In this context, the use of cows as oocyte donors has shown itself as an interesting alternative, once IVEP and OPU being applied on young animals selected for higher fertility and follicular production would be highly efficient. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* production potential of bovine embryos obtained from Nelore cows presenting high or low number of ovarian antral follicles, through the assessment of a great number of OPUs carried out in pre-synchronized follicular waves. The Nelore (*Bos indicus*) cows aging from 24 to 36 months were classified as high-AFC cows, when presented an average of 23 to 40 follicles (n = 8), and low-AFC cows, when presented an average up to 12 follicles (n = 8). All animals were synchronized and were submitted to OPU five days later. Recovered oocytes underwent *in vitro* maturation, fertilization and culture. Embryo production rates were assessed. The data were considered non-parametric and analyzed by the Kruskal-Wallis Test, for independent samples, with significance level of 1%. The percentages were analyzed by Chi-square Test, with significance level of 5%. Were aspirated 1445 oocytes from high-AFC cows and 381 oocytes from low-AFC. The high-AFC group, compared to the low-AFC group, obtained higher mean aspirated oocytes/OPU (30.1 ± 14.9 vs. 7.9 ± 3.8 ; $p < 0.01$); cultured oocytes/OPU (24.6 ± 12.3 vs. 5.9 ± 2.8 , $p < 0.01$); cleaved embryo/OPU (19.8 ± 9.7 vs. 4.46 ± 2.37); blastocysts in D7/OPU (9.7 ± 6.4 vs. 1.5 ± 1.6 , $p < 0.01$); and blastocysts in D10/OPU (10.3 ± 6.5 vs. 1.7 ± 1.8 , $p < 0.01$). Percentage of cleavage in relation to cultured oocytes wasn't different between the two groups (80.4% vs. 75.6%, $p < 0.01$) and the percentage of blastocysts, in D7 and D10, about relation to cultured oocytes, were superior of the group with high-AFC (39.8% and 41.8%, $p < 0.01$) comparison to the group with low-AFC (26.1% and 29.0%, $p < 0.01$). Therefore, it is possible to conclude that high-AFC animals achieve better IVEP rates than females with small antral follicle count.

Keywords: *Bos indicus*. Oocyte. IVEP. Fertility. AFC

¹ Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

² Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Dracena, SP, Brasil

⁴ PROGEST Biotecnologia em Reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil

⁶ Qualis *In vitro*, Presidente Prudente, SP, Brasil

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia mundialmente reconhecida como importante ferramenta utilizada para otimizar a seleção e multiplicação de animais de méritos produtivo e genético superiores (PONTES et al., 2009). A técnica permite maximizar a utilização de doses de sêmen de alto valor econômico, determinar o sexo dos embriões produzidos, e pode ainda ser aplicada em conjunto com outras biotécnicas reprodutivas, tais como aspiração folicular ovariana (OPU - Ovum Pick-up). Esta última, possibilita utilizar uma nova onda folicular da mesma fêmea a cada semanas, bem como recuperar o material genético de novilhas, fêmeas gestantes ou de elevado mérito que se tornaram estéreis devido a causas extra-ovarianas (PONTES et al., 2011). Nesse contexto, a utilização de ambas as técnicas, PIVE e OPU, na seleção de animais com maiores índices de fertilidade é de grande utilidade.

Existem evidências de que a população folicular antral (PFA) de uma fêmea, está diretamente relacionada com a fertilidade do rebanho, e que a quantidade de folículos que emergem durante a onda folicular pode influenciar a qualidade oocitária, e conseqüentemente a produção de embriões e taxa de prenhez (MOSSA et al., 2012). Muitos estudos apontam essa característica como uma importante e confiável ferramenta, que poderia prever o potencial reprodutivo do animal e tornar a seleção de doadoras com alta capacidade para produção *in vitro* de embriões mais eficiente (RICO et al., 2012, STOJSIN-CARTER et al., 2016).

Resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa são altamente controversos, reforçando a necessidade de considerar diferenças entre subespécies bovinas, idade dos animais, número de OPU, tempo de OPU, fase das ondas foliculares e biotécnicas realizadas (MOSSA et al. 2012, SANTOS et al., 2013). Compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nessas diferenças e a influência da quantidade de folículos sobre a fertilidade é de grande importância e necessidade para o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida e para o desenvolvimento de alternativas que otimizem a produtividade do rebanho. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) com alta e baixa contagem de folículos antrais ovarianos.

Material e Métodos

Local

O experimento, aprovado pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” (CEUA), protocolo número 2342, foi realizado na Fazenda Experimental da UNOESTE, localizada no município de Presidente Bernardes-SP, com latitude 22°17'13,93” Sul e longitude 51°41'01,08” Oeste, no período de outubro de 2014 a janeiro de 2015. O Clima de Presidente Bernardes é denominado Tropical semiúmido mesotérmico segundo a classificação de KÖPPEN e apresenta verão quente e úmido, com temperaturas médias anuais em torno de 24 °C e temperatura máxima que pode chegar à 40 °C nos meses mais quentes. Os índices pluviométricos mantêm uma média de 1.200 mm/ano.

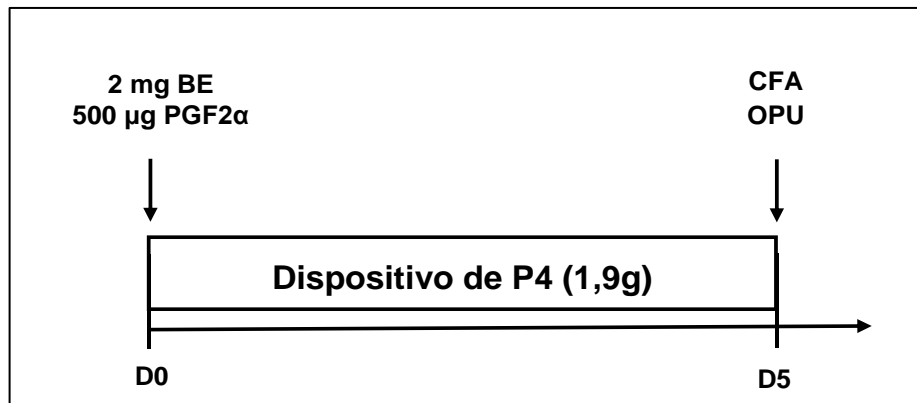
Animais

Foram utilizadas 30 fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com idade entre 24 a 36 meses, apresentando escores de condição corporal de 2,5 a 3,5 (em escala de 1 a 5, de acordo com LOWMAN et al., 1976) e peso de 418,5 ± 22, 5Kg em média. Os animais foram mantidos em pastagem em *Brachiaria decumbens*, com água e sal mineral “*ad libitum*” por um período de adaptação anterior até ao final do período da pesquisa. Receberam 1,7 kg/dia de suplemento alimentar com 72% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e 24% de proteína bruta, contendo 53% de farelo de soja (44% de proteína bruta) e 47% de milho.

Contagem de folículos antrais

Com o intuito de obter oócitos de folículos em fase de crescimento, e com o mesmo padrão de desenvolvimento folicular, cinco dias antes de cada sessão de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) foi realizada a sincronização de onda folicular das doadoras, sendo todas tratadas com o mesmo protocolo (Figura 01).

Figura 1 - Protocolo hormonal de sincronização de onda folicular das doadoras realizado antes dos procedimentos de OPUs.



BE: benzoato de estradiol, PGF2 α : prostaglandina 2 α , P4: progesterona, CFA: contagem de folículos antrais, OPU: aspiração folicular.

Em dia aleatório do ciclo estral (D0), foram aplicados, por via intramuscular (IM), 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin® Biofarm, Jaboticabal, SP, Brasil) e 500 μ g de prostaglandina 2 α (PGF2 α , Ciosin®, Intervet-Schering Plough, Brasil), além da inserção de um dispositivo intravaginal de 1,9g de progesterona (P4, CIDR®, Zoetis, Brasil).

No quinto dia (D5), após a aplicação, o dispositivo foi retirado e a contagem de folículos antrais das 30 fêmeas foi realizada por ultrassonografia (Aloka SSD 500, 5MHz-transvaginal probe, Japão) antes de cada sessão de OPU. Após a avaliação, 16 doadoras foram selecionadas de acordo com a distribuição normal dos dados, e classificadas como vacas com alta CFA (n = 8), quando apresentaram entre 23 e 40 folículos e vacas com de baixa CFA (n = 8), quando apresentaram entre 6 e 12 folículos.

Aspiração folicular de oócitos

Antes de cada OPU foi realizada anestesia epidural com 3mL da associação de cloridrato de lidocaína 2% (2,5 mL) com cloridrato de xilazina 0,1% (0,5 mL).

A aspiração folicular foi realizada de acordo com Seneda et al. (2001). Cada doadora foi submetida à seis procedimentos de OPU com intervalos de 14 dias. Folículos visíveis \geq 2 mm de diâmetro foram aspirados utilizando aparelho de

ultrassom e transdutor convexo encaixado em uma guia de aspiração (Aloka SSD 500; sonda transvaginal 5MHz, Japão). Para aspiração dos folículos foram utilizadas agulhas hipodérmicas de 19G, descartáveis, e ligadas a uma bomba de vácuo de 80 mmHg (VMAR-5100, Cook Veterinary Products, Austrália).

Posteriormente, os oócitos recuperados foram avaliados visualmente em lupa estereomicroscópica (Nikon SMZ800N, Japão), e classificados de acordo com o aspecto morfológico dos COC's, segundo Lonergan et al., (2001), em 5 grupos de qualidade, onde, Grau I = oócitos com células do cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II = células do cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do cumulus presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular. Oócitos classificados como atrésicos foram descartados e os demais, transportados até o laboratório para maturação, por no máximo 2h, a uma temperatura de 39° C em incubadora portátil (Minitub, Alemanha).

Maturação in vitro

Para a maturação *in vitro* (MIV), grupos de no máximo 25 complexos cumulus-oócitos foram colocados em gotas de 100 µL de meio de maturação contendo meio TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg / mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá) e 10% de SFB (Nutricell Ltda, Brasil). Oócitos de cada doadora foram maturados separadamente em placas de petri (35x10 mm) contendo as gotas de meio recobertas com óleo mineral. A incubação foi realizada em estufa com atmosfera gasosa com 5% de CO₂, temperatura de 39° C e umidade saturada, durante um período de 24 horas.

Fertilização in vitro

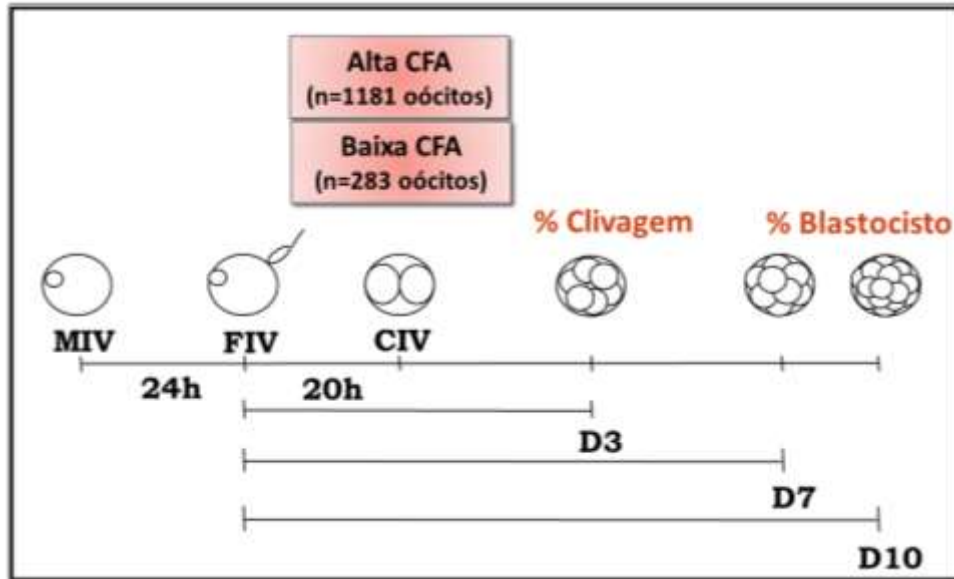
Na fertilização *in vitro* (FIV), a seleção de espermatozóides foi realizada pela técnica de gradiente de Percoll. Assim, Percoll à 90% foi depositado no fundo do tubo Falcon de 10 mL e o Percoll à 45% foi colocado na camada superior. As palhetas de sêmen, foram descongeladas a 37° C durante 30 segundos. Para a fertilização foram utilizados dois touros da raça Nelore, de fertilidade reconhecida, minimizando a interferência nos resultados de fecundação devido à interação vaca/touro. A amostra de sêmen foi cuidadosamente depositada na superfície da solução de Percoll à 45% e o tubo centrifugado à 200G, durante 10 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de TALP-FERT (mais 20 mg/mL de heparina e PHE: 2 mM de penicilina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina). Subsequentemente, a contagem de espermatozoides foi realizada em Câmara de Neubauer. O vigor e a motilidade dos espermatozoides foram avaliados por microscopia óptica (NIKON, Eclipse E400, Japão) e a concentração espermática ajustada para obtenção de uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides vivos/100 µL. Os oócitos foram co-incubados com espermatozóides em gotas de 90 µL de TALP-FERT e colocados na incubadora com atmosfera gasosa de 5% de CO₂, temperatura de 39°C e umidade saturada, durante 20 horas. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

Cultivo de embriões in vitro

No cultivo *in vitro* (CIV), as células do cumulus foram removidas por sucessivas pipetagens e os possíveis zigotos foram transferidos para gotas de 90 µL de meio de cultura SOF-M (modificado). No D3 (72 hpi), avaliou-se a taxa de clivagem e realizou-se o primeiro “feeding”, ou seja, 50% do volume da gota de cultivo foi removido e posteriormente adicionado o mesmo volume de meio fresco. Este procedimento foi repetido no D5 (120hpi). O cultivo dos embriões foi realizado nas mesmas condições descritas para MIV e FIV e o desenvolvimento embrionário avaliado no sétimo e décimo dias após a inseminação (Figura 2).

Figura 2 – Figura esquemática da produção *in vitro* e avaliação das taxas de clivagem e blastocisto.



Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram considerados não paramétricos e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, utilizando o Statistic Software 13 (Dell Inc. 2015). Assim, foram avaliadas as variáveis: oócitos aspirados/OPU; oócitos viáveis cultivados/OPU; oócitos clivados/OPU; blastocistos produzidos no D7/OPU e blastocistos produzidos no D10/OPU. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,01$.

O teste Kruskal-Wallis é considerado uma alternativa não paramétrica para a ANOVA com um fator. Determina se as medianas de dois ou mais grupos são diferentes quando os dados não são simétricos (CAMPOS, 1983). No entanto, os resultados foram apresentados utilizando-se as médias e desvio padrão das variáveis estudadas para facilitar sua interpretação. Tal procedimento é previsto na literatura por Campos (1983).

Adicionalmente, foram comparadas as porcentagens de oócitos clivados em relação ao número de oócitos cultivados; e de blastocistos totais produzidos, no D7 e D10, em relação ao número de oócitos cultivados. Com o intuito de estabelecer as diferenças entre os grupos amostrais (alta e baixa CFA) realizou-se

o teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%, utilizando o Statistic Software 13 (Dell Inc. 2015).

Resultados

Do total de 6 OPU realizadas por animal, observou-se maior número de oócitos aspirados e de oócitos viáveis cultivados em fêmeas de alta CFA. Da mesma maneira, o número médio de oócitos aspirados/OPU e cultivados/OPU foram maiores no grupo de alta CFA, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Número total e média por OPU de oócitos aspirados e cultivados de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).

| Grupo | Animais (n) | Total OPUs (n) | Oócitos aspirados (n) | Média de oócitos aspirados/OPU \pm DP | Oócitos viáveis cultivados (n) | Média oócitos viáveis cultivados/OPU \pm DP |
|-----------|-------------|----------------|-----------------------|---|--------------------------------|---|
| Alta CFA | 8 | 48 | 1445 | 30.1 \pm 14.9 | 1181 | 24.6 \pm 12.3 |
| Baixa CFA | 8 | 48 | 381 | 7.9 \pm 3.8 | 283 | 5.9 \pm 2.8 |
| Valor p | | | | 0.000 | | 0.000 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.01$.

A média de embriões clivados por OPU foi maior no grupo de alta CFA, no entanto, não houve diferença na porcentagem de embriões clivados em relação ao número de oócitos cultivados. O número total, a média de blastocistos produzidos por OPU, e a porcentagem de blastocistos em relação ao número de oócitos cultivados, no D7 e no D10, foram maiores para as vacas de alta CFA (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Número total e média por OPU de embriões clivados e blastocistos (BI), no D7 e D10, de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).

| Grupo | Embriões clivados (n) | Média Embriões clivados/OPU \pm DP | BI Total D7 (n) | Média BI D7/OPU \pm DP | BI Total D10 (n) | Média BI D10/OPU \pm DP |
|-----------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| Alta CFA | 949 | 19.8 \pm 9.7 | 470 | 9.7 \pm 6.4 | 494 | 10.3 \pm 6.5 |
| Baixa CFA | 214 | 4.5 \pm 2.4 | 74 | 1.5 \pm 1.6 | 82 | 1.7 \pm 1.8 |
| Valor p | | 0.000 | | 0.000 | | 0.000 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.01$.

Tabela 3. Número total e porcentagem de embriões clivados e blastocistos (BI) em relação ao número de oócitos cultivados de vacas da raça Nelore com alta CFA (23-40 folículos) e baixa CFA (6-12 folículos).

| Grupo | Embriões clivados (n) | % Embriões clivados/oócitos cultivados | BI Total D7 (n) | % BI D7/oócitos cultivados | BI Total D10 (n) | % BI D10/oócitos cultivados |
|-----------|-----------------------|--|-----------------|----------------------------|------------------|-----------------------------|
| Alta CFA | 949 | 80.4 | 470 | 39.8 | 494 | 41.8 |
| Baixa CFA | 214 | 75.6 | 74 | 26.1 | 82 | 29.0 |
| Valor p | | 0.937 | | 0.002 | | 0.000 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.01$.

Discussão

A contagem de folículos antrais ovarianos tem sido objeto de muitos estudos recentes no campo da reprodução animal. Compreender melhor a influência da quantidade de folículos sobre índices de fertilidade é de grande interesse para o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida e para o desenvolvimento de alternativas que otimizem a produtividade do rebanho.

No atual estudo constatou-se que fêmeas *Bos indicus* da raça Nelore, com maior CFA (23-40 folículos) apresentaram melhor desempenho na produção *in vitro* de embriões quando comparadas com fêmeas com baixa CFA (6-12 folículos).

Houve uma vantagem quantitativa dos animais com alta CFA em relação ao número médio de oócitos aspirados e viáveis (Tabela 1) e embriões produzidos no D7 e D10 (Tabela 2), estando de acordo com os resultados obtidos por Pontes et al. (2011) e Monteiro et al. (2017), que também avaliaram vacas Nelore.

O mesmo foi observado para as variáveis relacionadas aos índices percentuais de desenvolvimento *in vitro* (Tabela 2). Assim como Santos et al. (2014), no presente trabalho foram obtidas maiores taxas de blastocistos de vacas de alta CFA quando comparadas com vacas de baixa CFA

É importante ressaltar que no presente trabalho foram realizados seis procedimentos de aspiração folicular (OPUs), com intervalo de 14 dias, todos após a sincronização de ondas foliculares, o que permitiu uma avaliação mais criteriosa dos animais classificados de acordo com a CFA e reforçou a superioridade das fêmeas *Bos indicus* com alta CFA na produção *in vitro* de embriões.

A realização de sincronização de onda folicular dos animais antes de todas as seções de aspiração, é considerado outro aspecto altamente positivo dessa pesquisa. Tal prática possibilitou que todas as doadoras estivessem na mesma fase de crescimento da onda folicular, no momento da OPU, minimizando seu efeito aleatório. A sincronização de onda possibilita melhor aproveitamento de folículos recrutados e a obtenção de oócitos de melhor qualidade, resultando em um maior potencial de desenvolvimento *in vitro* (MACHATKOVÁ et al., 2000).

Utilizando ovários de abatedouro também de fêmeas *Bos indicus*, Rosa (2015) não observou diferenças na produção embrionária entre os grupos alta CFA (> 92 folículos, 40,6%), intermediária (46 a 76 folículos, 36,3%) e baixa CFA (< 31 folículos, 38,6%). Deve-se observar que autores adotam diferentes limites numéricos de folículos que definem as classificações dos grupos com distintas CFA. No trabalho de Rosa (2015), essas foram bem maiores do que nos trabalhos anteriormente aqui discutidos, podendo explicar essa aparente divergência nos resultados.

As taxas de blastocistos obtidas neste estudo, também discordam dos encontrados por Ireland et al. (2007), que não observaram diferença estatística entre os grupos CFA alta (≥ 40) e baixa (≤ 15) em vacas de origem *Bos taurus*. Provavelmente essa contradição pode ser devido à diferença nas raças estudadas. A razão pela qual os embriões que se originaram de vacas de alta CFA, possuíam maior potencial de desenvolvimento *in vitro*, poderia ser explicado pelo fato de que mais folículos em desenvolvimento produzem mais hormônios ovarianos, enriquecendo o ambiente dos folículos. Foi demonstrado em animais *Bos taurus* que os níveis circulantes de progesterona durante o diestro foram maiores nos animais com alta CFA ($7,6 \pm 0,3$ ng / mL) do que naqueles com baixa ($6,5 \pm 0,3$ ng / mL) independente se estavam prenhas ou não (MARTINEZ, 2016).

Ainda, folículos de vacas com maiores CFA mostram mais expressão de RNAm das enzimas CYP17A1 e 3BHSD, envolvidos na conversão de andrógenos, quando comparados com vacas de baixa CFA (LOUREIRO et al., 2016). Sabendo que os andrógenos podem atuar como substrato para produção de estradiol (TANIGUCHI et al., 2007), e conseqüentemente, aumentar os fatores de crescimento em células da granulosa (DUMESIC et al., 2008; BONILLA et al., 2011), seria razoável inferir que as vacas de alta CFA fornecem um melhor ambiente de desenvolvimento para os oócitos.

O melhor ambiente folicular também pode estar refletindo a maior média de oócitos viáveis observada para os animais com alta CFA (Tabela 1), visto que, elevadas concentrações de estradiol intrafolicular (IRELAND et al., 2009) e reduzidos níveis de FSH (IRELAND et al., 2007), podem impactar positivamente a qualidade do oócito desse grupo de animais. Da mesma maneira, vacas com alta CFA apresentaram elevadas concentrações plasmáticas do AMH e maior número de oócitos saudáveis, sendo considerado um bom marcador endócrino do tamanho da reserva ovariana e do *pool* de folículos em desenvolvimento (BARUSELLI et al., 2015).

O presente estudo mostrou taxas de clivagem semelhantes para alta e baixa CFA (81 ± 11 e 76 ± 19 , respectivamente, $p < 0,01$), assim como relatado por outros autores ao também avaliarem animais da raça Nelore (GUERREIRO et al., 2014; ROSA, 2016) e animais cruzados *Bos indicus* x *Bos taurus* (SILVA-SANTOS, 2014). Analisando os resultados de clivagem e blastocisto em conjunto, é possível supor que os oócitos cultivados de ambos os grupos, foram capazes de sofrer maturação adequada e clivagem. No entanto, em algum momento embriões originados do grupo de baixa CFA não foram capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto apresentando menor capacidade de ativação do genoma embrionário no período pré-implantação e maior taxa de bloqueio, provavelmente em consequência de um pior ambiente folicular de onde foram recuperados (IRMAK et al., 2005).

Levando em consideração a alta repetibilidade do número de oócitos recuperados e da produção de embriões *in vitro* por doadora, a seleção de vacas com maior quantidade de folículos antrais poderia acelerar o melhoramento genético em rebanhos (MONTEIRO et al., 2017), embora esse critério de seleção deva ser utilizado em conjunto com outras características de mérito genético para a escolha de matrizes. Entretanto, cabe ressaltar, que avaliação ultrassonográfica da CFA é um método eficiente para seleção de doadoras da raça Nelore com maior potencial para PIVE.

Conclusões

Pode-se concluir que fêmeas *Bos indicus*, da raça Nelore com alta CFA apresentaram melhores índices de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Referências

Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*, 2015; 12:487-497.

Bonilla AQ, Oliveira LJ, Ozawa M, Newsom EM, Lucy MC, Hansen PJ. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332:170–9.

Campos H. Estatística experimental não-paramétrica. 4.ed. Piracicaba: ESALQ, 1983. 349 p.

Dell Statistics (data analysis software system), version 13. <software.dell.com>.

Dumesic DA, Abbott DH. Implications of polycystic ovary syndrome on oocyte development. *Semin Reprod Med* 2008; 26:53–61.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 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. *Hum Reprod* 2007; 22:1687–1695.

Irmak MK, Topal T, Oter S. Melatonin seems to be a mediator that transfers the environmental stimuli to oocytes for inheritance of adaptive changes through epigenetic inheritance system. *Medical Hypotheses* 2005; 64:1138 – 1143.

Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41:427-37.

Lowman BGN, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle. Edinburgh: The Edinburgh School of Agriculture, 1976. 5 p. (East of Scotland College of Agriculture. Bulletin, 6).

Machatková M, Jokesova E, Horky F, Krepelova A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 2000; 54: 543-550.

Martinez MF, Sanderson N, Quirke LD, Lawrence SB, Juengel JL. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 2016; 85: 466-475.

Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi, SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more *in vitro* embryos compared to cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology* 2017; 90:54-58.

Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, et al. evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction* 2010; 140:713–20.

- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012; 95:2355–2361.
- Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; 75:1640–6.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros RR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009; 71:690–7.
- Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, 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. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012; 24:932–944.
- Rosa CO. Comparação da produção *in vitro* de embriões entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) de alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.
- Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Blaschi W, Morotti F, Silva CB, Moraes FLZ, Giudicissi DPL, Seneda MM. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim Reprod* 2013; 10:451
- Seneda MM, Esper CR, Gacia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 2003; 59:1435–40.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* 2001; 67:37-43.
- Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio T N, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DCM, Seneda MM. 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*, 2014; 49:228-232.
- Stojsin-Carter A, Mahboubi K, Costa NN, Gillis DJ, Carter TF, Neal MS, Miranda MS, Ohashi OM, Favetta LA, King WA. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Anim Reprod Sci.* 2016 Apr; 167:51-8.

ARTIGO 02: EFEITO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS DE VACAS DA RAÇA GIROLANDO NA TAXA DE BLASTOCISTO E PREENHEZ DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Sheila Merlo Garcia¹; Paula Alvares Lunardelli²; Kleber Luciano Ancioto³, José Otávio Folino Silva⁴, Eduardo Cardoso de Oliveira⁵, Marcelo Marcondes Seneda².

Resumo: Pesquisas tem demonstrado grande interesse em avaliar características capazes de tornar a seleção de doadoras de oócitos mais eficiente quanto aos resultados da OPU-PIVE, como por exemplo, a contagem de folículos antrais (CFA). No entanto, os resultados encontrados são controversos e nenhuma delas, até o momento, avaliaram animais mestiços *Bos indicus* x *Bos taurus* de aptidão leiteira. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Girolando (*B. indicus* x *B. taurus*) com alta e baixa CFA, bem como a taxa de prenhez nas receptoras destes embriões. Para tanto, a CFA foi avaliada por ultrassonografia antes de cada sessão de OPU. As doadoras submetidas à 3-5 OPU, foram classificadas como vacas de alta CFA (entre 35-52 folículos, n = 13), e vacas de baixa CFA (entre 11-17 folículos, n = 15). Os oócitos recuperados foram enviados para PIVE. A produção de embriões foi avaliada no sétimo dia após a inseminação, para se determinar as taxas de blastocistos; e a taxa de prenhez foi observadas aos 30 dias após a transferência. Os dados obtidos foram considerados não paramétricos e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, e as porcentagens pelo teste de qui-quadrado, ambos com nível de significância de 5%. Foram aspirados 1919 oócitos de vacas de alta CFA e 775 oócitos de vacas de baixa CFA. O grupo de alta CFA, comparativamente ao grupo de baixa CFA, obteve maiores médias de oócitos aspirados/OPU ($42,6 \pm 5,2$ vs $14,6 \pm 1,9$; $p < 0,01$); oócitos cultivados/OPU ($38,1 \pm 6,6$ versus $12,3 \pm 2,8$; $p < 0,01$); porcentagens de blastocistos no D7 em relação aos oócitos cultivados (23,0% vs. 18,4%, $p < 0,05$); porcentagem de prenhez em relação ao total de blastocistos transferidos (42,7% vs. 39,7%, $p < 0,05$). Portanto, pode-se concluir que na produção *in vitro* de embriões, melhores taxas de blastocisto e prenhez são obtidas de vacas da raça Girolando com maiores contagens de folículos antrais.

Palavras Chave: *B. indicus* x *B. taurus*. Oócito. PIVE. Taxa de Prenhez. Fertilidade. CFA

Abstract: Researchers have focused their attention on validating predictive features that could make oocyte donors selection more efficient regarding OPU-IVEP outcomes, as their antral follicle count (CFA). However, studies have raised controversial results and none of them have assessed dairy crossbreeds so far. Thus, the aim of the present study was to investigate embryo production and pregnancy rates obtained from Girolando (*B. indicus* x *B. taurus*) cows with high and low antral folliclecount. The antral follicles counting (CFA) of cows was assessed through by ultrasonography before every OPU session. Donors were classified as high-CFA cows, (average of 35 to 52 follicles; n = 13), and low-CFA cows (average of 11 to 17 follicles; n = 15) and submitted to 3-5 OPU with a 14-day interval. The obtained data were considered non-parametric and analyzed by the Kruskal-Wallis test for independent

samples, and the chi-square test percentages, both with a significance level of 5%. Were aspirated 1919 oocytes from high-AFC cows and 775 low-AFC cow oocytes. The high-ACF group, compared to the low-ACF group, obtained higher mean values of aspirated oocytes/OPU (42.6 ± 5.2 vs. 14.6 ± 1.9 ; $p < 0.01$); cultured oocytes/OPU (38.1 ± 6.6 versus 12.3 ± 2.8 ; $p < 0.01$); percentages of blastocysts in D7 relationship to cultured oocytes (23.0% vs. 18.4%, $p < 0.05$); percentage of pregnancy in relation to total blastocysts transferred (42.7% vs. 39.7%, $p < 0.05$). In conclusion, higher pregnancy rates are obtained from females with larger antral follicle count.

Keywords: *B. indicus* x *B. taurus*. Oocyte. IVEP. Pregnancy rate. Fertility. AFC

¹ Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

² Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

³ Gene Up, Presidente Prudente, SP, Brasil

⁴ Qualis *in vitro*, Presidente Prudente, SP, Brasil

⁵ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil

Introdução

O aumento gradativo do uso de biotécnicas da reprodução animal, vem contribuindo significativamente para acelerar o ganho genético do rebanho (PONTES et al., 2009). Técnicas como inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação (SOV), transferência de embrião (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), associada à aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU - da sigla *ovum pick-up*), são ferramentas de extrema importância, que favorecem a multiplicação e a seleção de animais de méritos produtivo e genético superiores (SANTOS et al., 2016).

Nos rebanhos leiteiros, as biotécnicas também possibilitam otimizar a utilização de sêmens de elevado valor econômico, a escolha do sexo dos embriões, mediante utilização de sêmen sexado e a seleção das melhores doadoras de oócitos (PONTES et al., 2011). O gado híbrido, como as vacas Girolando (Gir x Holandês), tem sido muito popular nas fazendas leiteiras, especialmente na América Central e do Sul, devido à alta produção de leite, herdada de animais *Bos taurus*, e maior rusticidade e população folicular, herdada de animais *Bos indicus* (PONTES et al., 2010)

Com o objetivo de melhorar ainda mais os resultados obtidos pela OPU-PIVE, os pesquisadores concentraram sua atenção no estudo de características capazes de tornar a seleção de doadoras mais eficiente, como por exemplo, a contagem de folículos antrais ovarianos. No entanto, alguns estudos têm observado opiniões controversas sobre uma possível relação entre o número de folículos e a fertilidade (MOSSA et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SILVA-SANTOS et al., 2014b), e nenhum deles avaliou esta questão em animais cruzados *Bos indicus* x *Bos taurus* com aptidão para produção de leite. Entretanto, questões que esclareçam melhor a relação da CFA com a fertilidade e com a eficiência das biotécnicas de reprodução, devem ser estudadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de produção *in vitro* de embriões bovinos de vacas da raça Girolando (*B. indicus* x *B. taurus*) com alta e baixa contagem de folículos antrais ovarianos, bem como a taxa de prenhez nas receptoras destes embriões.

Material e Métodos

Local

O estudo foi realizado na Região de Presidente Prudente, localizada a Oeste do estado de São Paulo, Latitude: 22 7' 39" Sul, Longitude: 51 23' 8" Oeste.

Animais

Foram utilizadas 50 vacas multíparas da raça Girolando com idade entre 24 e 72 meses, vazias em lactação, apresentando escores de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (em escala de 1 a 5, de acordo com LOWMAN et al., 1976); peso de 525 ± 25 Kg em média, e mantidas em pastagem em *Brachiaria decumbens*, com água e sal mineral “*ad libitum*” até o final do período da pesquisa.

Contagem de Folículos Antrais

A contagem de folículos antrais (CFA) das 50 vacas foi realizada por ultrassonografia (Aloka SSD 500, 5MHz-transvaginal probe, Japão) antes de cada

sessão de OPU. Após a avaliação 28 doadoras foram selecionadas de acordo com a distribuição normal dos dados, e classificadas como vacas de alta CFA (n = 13), quando apresentaram entre 35 a 52 folículos e vacas de baixa CFA (n = 15), quando apresentaram entre 11 a 17 folículos.

Aspiração folicular de oócitos

Antes de cada OPU foi realizada anestesia epidural com 3mL da associação de cloridrato de lidocaína 2% (2,5 mL) com cloridrato de xilazina 0,1% (0,5 mL).

A aspiração folicular foi realizada de acordo com Seneda et al., (2001). Em cada doadora se realizou de três a cinco procedimentos de OPU. Folículos visíveis ≥ 2 mm de diâmetro foram aspirados utilizando aparelho de ultrassom e transdutor convexo encaixado em uma guia de aspiração (Aloka SSD 500; sonda transvaginal 5MHz, Japão). Para aspiração dos folículos foram utilizadas agulhas hipodérmicas de 19G, descartáveis, e ligadas a uma bomba de vácuo de 80 mmHg (VMAR-5100, Cook Veterinary Products, Austrália).

Posteriormente, os oócitos recuperados foram avaliados visualmente em lupa estereomicroscópica (Nikon SMZ800N, Japão), e classificados de acordo com o aspecto morfológico dos COC`s, segundo Lonergan et al., (2001), em 5 grupos de qualidade, onde, Grau I = oócitos com células do cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II = células do cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do cumulus presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular. Oócitos classificados como atrésicos foram descartados e os demais, transportados até o laboratório para maturação, por no máximo 2h, a uma temperatura de 39°C em incubadora portátil (Minitub, Alemanha).

Maturação in vitro

Para a maturação *in vitro* (MIV), grupos de no máximo 25 oócitos foram colocados em gotas de 100 µL de meio de maturação contendo meio TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 mcg/mL de piruvato de sódio, 50 mcg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá) e 10% de SFB (Nutricell Ltda, Brasil). Oócitos de cada doadora foram maturados separadamente em placas de petri (35x10 mm) contendo as gotas de meio recobertas com óleo mineral. A incubação foi realizada em estufa com atmosfera gasosa com 5% de CO₂, temperatura de 39°C e umidade saturada, durante um período de 24 horas.

Fertilização in vitro

Na fertilização *in vitro* (FIV), a seleção de espermatozoides foi realizada pela técnica de gradiente de Percoll. Assim, Percoll à 90% foi depositado no fundo do tubo e o Percoll à 45% foi colocado na camada superior. As palhetas de sêmen, foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos. Na produção *in vitro* dos embriões foram utilizados 15 touros da raça Holandesa. A amostra de sêmen foi cuidadosamente depositada na superfície da solução de Percoll a 45% e o tubo centrifugado à 200G durante 10 minutos.

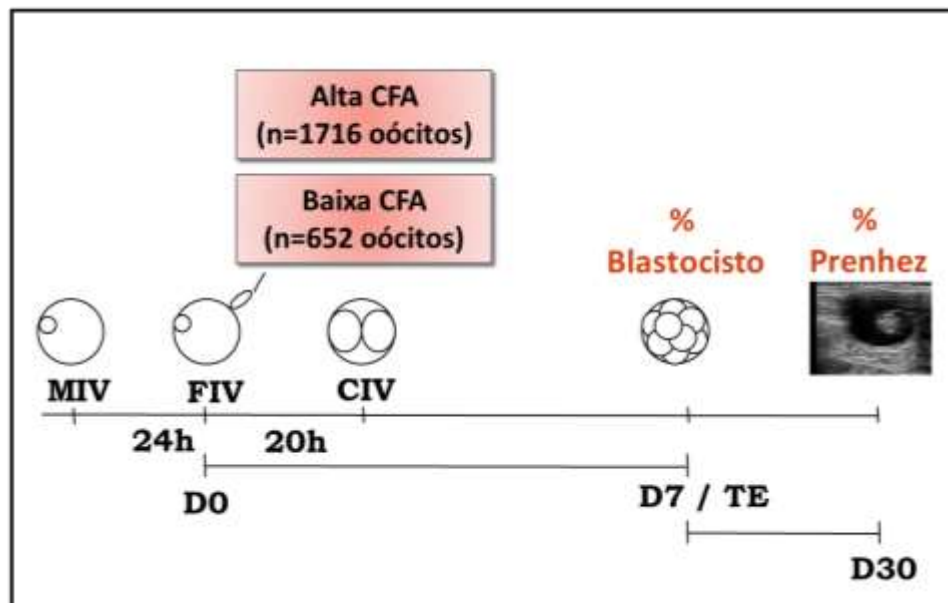
Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o "sedimento" foi ressuspenso em 50 mL de TALP-FERT (mais 20 mg/mL de heparina e PHE: 2 mM de penicilina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina). Subsequentemente, a contagem de espermatozoides foi realizada em Câmara de Neubauer. O vigor e a motilidade dos espermatozoides foram avaliados por microscopia óptica (NIKON, Eclipse E400, Japão), e a concentração espermática ajustada para obtenção de uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides vivos/100 µL. Os oócitos foram co-incubados com espermatozoides em gotas de 90 µL de TALP-FERT e colocados na incubadora com atmosfera gasosa de 5% de CO₂, temperatura de 39°C e umidade saturada, durante 20 horas. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

Cultivo de embriões *in vitro*

No cultivo *in vitro* (CIV), as células do cumulus foram removidas por sucessivas pipetagens, e os possíveis zigotos foram transferidos para gotas de 90 μ L de meio de cultura SOF-M (modificado). No D3 (72 hpi) e no D5 (120 hpi), realizou-se o “feeding”, ou seja, 50% do volume da gota de cultivo foi removido e posteriormente adicionado o mesmo volume de meio fresco. O cultivo dos embriões foi realizado nas mesmas condições descritas para MIV e FIV.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado sete dias (D7) após a fertilização, e os embriões classificados de acordo com sua morfologia, sendo que apenas os de Grau I (IETS, 1998), em estádios de mórula e blastocistos, foram destinados à transferência (Figura 1).

Figura 1 – Figura esquemática da produção *in vitro*, avaliação das taxas de blastocisto e prenhez.



Sincronização das receptoras

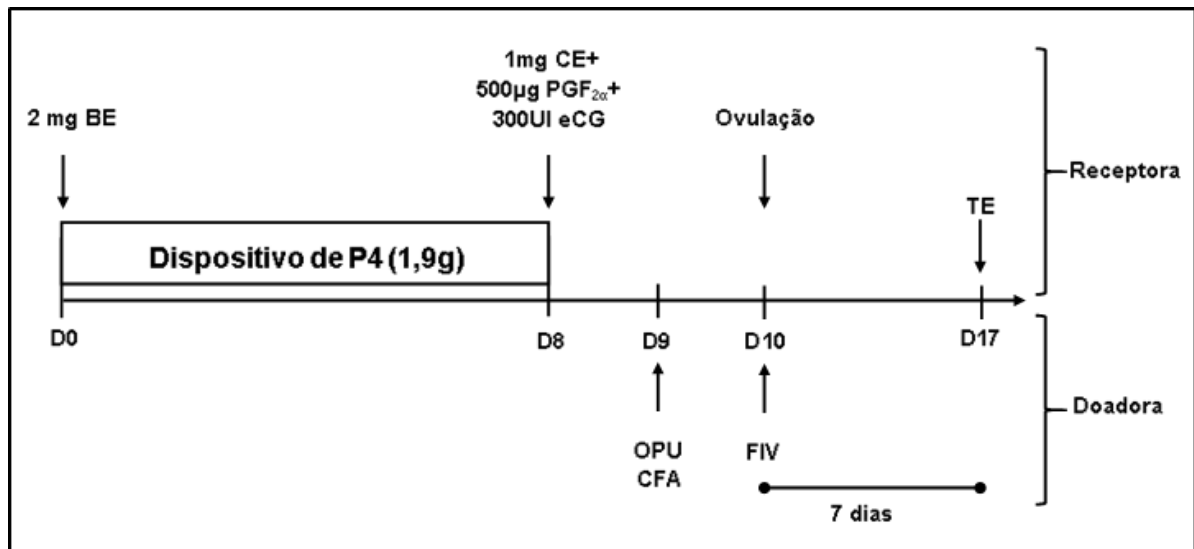
As vacas receptoras foram submetidas a sincronização da ovulação, sendo todas tratadas com o mesmo protocolo (Figura 2)

Em dia aleatório do ciclo estral (D0), foi aplicado, por via intramuscular (IM), 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin® Biofarm, Jaboticabal, SP, Brasil)

e a inserção de um dispositivo intravaginal de 1,9g de progesterona (P4, CIDR®, Zoetis, Brasil). Na retirada do implante (D8), as receptoras receberam 500 µg prostaglandina 2α (PGF2α, Ciosin®, Intervet-Schering Plough, Brasil), 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®, Syntex SA, Argentina) e 1mg de cipionato de estradiol (CE, ECP®, Pfizer, Brasil), IM. No D17, foram realizadas as transferências dos embriões (TE). Todas receptoras foram avaliadas por ultrassonografia (Aloka SSD 500; 5MHz-transvaginal probe, Japão) e somente aquelas que apresentavam corpo lúteo foram selecionadas para inovulação.

As aspirações foliculares nas vacas doadoras foram feitas sempre no D9 do protocolo de sincronização das receptoras e a fertilização *in vitro*, no D10 (Figura 2)

Figura 2 - Protocolo hormonal de sincronização de ovulação utilizado em vacas receptoras dos embriões, e esquema cronológico de aspiração de doadoras.



BE: benzoato de estradiol, P4: progesterona, PGF2α: prostaglandina 2α, eCG: gonadotrofina coriônica equina, CE: cipionato de estradiol, TE: transferência de embrião.

Transferência de embrião e diagnóstico de prenhez

Embriões de sete dias foram envasados individualmente em palhetas de 0,25 mL, e transportados por no máximo 2 horas, em transportador de embriões WTA 100 (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil).

Foi transferido um embrião por receptora, de maneira não cirúrgica, transcervical, com anestesia epidural de lidocaína 2% sem vasoconstritor, e a prenhez foi determinada por avaliação ultrassonográfica (Aloka SSD 500; 5MHz-transvaginal probe, Japão) 30 dias após a inovulação (Figura 1).

Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram considerados não paramétricos e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, utilizando o Statistic Software 13 (Dell Inc. 2015). Assim, foram avaliadas as variáveis: oócitos aspirados/OPU; oócitos viáveis cultivados/OPU; blastocistos produzidos no D7/OPU; blastocistos transferidos/OPU e prenhez/OPU. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

O teste Kruskal-Wallis é considerado uma alternativa não paramétrica para a ANOVA com um fator. Determina se as medianas de dois ou mais grupos são diferentes quando os dados não são simétricos (CAMPOS, 1983). No entanto, os resultados foram apresentados utilizando-se as médias e desvio padrão das variáveis estudadas para facilitar sua interpretação. Tal procedimento é previsto na literatura por Campos (1983).

Adicionalmente, foram comparadas as seguintes porcentagens: de blastocistos totais produzidos no D7 em relação ao número de oócitos cultivados; de blastocistos transferidos em relação ao total de blastocistos produzidos; e de prenhez das receptoras em relação ao total de blastocistos transferidos. Com o intuito de estabelecer as diferenças entre os grupos amostrais (alta e baixa CFA) realizou-se o teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%, utilizando o Statistic Software 13 (Dell Inc. 2015).

Resultados

Do total de 45 aspirações realizadas nos animais de alta CFA e 53 aspirações realizadas nos animais de baixa CFA, obteve-se maior número médio de

oócitos aspirados por OPU e de oócitos viáveis cultivados por OPU em fêmeas com alta CFA conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Número total e média por OPU de oócitos aspirados e cultivados de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos).

| Grupos | Animais (n) | Total OPUs (n) | Oócitos aspirados (n) | Média de oócitos aspirados/OPU \pm DP | Oócitos viáveis cultivados (n) | Média oócitos viáveis cultivados/OPU \pm DP |
|-----------|-------------|----------------|-----------------------|---|--------------------------------|---|
| Alta CFA | 13 | 45 | 1919 | 42.6 \pm 5.2 | 1716 | 38.1 \pm 6.6 |
| Baixa CFA | 15 | 53 | 775 | 14.6 \pm 1.9 | 652 | 12.3 \pm 2.8 |
| Valor p | | | | 0.000 | | 0.000 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.01$.

O número total e a média de blastocistos produzidos por OPU no D7; a quantidade e a média de blastocistos transferidos por OPU; e a quantidade e a média de prenhez de receptoras por OPU, foram maiores para as vacas de alta CFA (Tabelas 2).

Tabela 2. Número total e média por OPU de blastocistos (BI) produzidos no D7, e blastocistos transferidos de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos) e numero total e média de prenhez por OPU nas receptoras destes embriões.

| Grupo | BI total D7 (n) | Média BI D7/OPU \pm DP | BI transferidos (n) | Média BI Transferidos/OPU \pm DP | Prenhez (n) | Média prenhez/OPU \pm DP |
|-----------|-----------------|--------------------------|---------------------|------------------------------------|-------------|----------------------------|
| Alta CFA | 394 | 8.7 \pm 5.3 | 328 | 7,3 \pm 4.4 | 140 | 3.1 \pm 3.0 |
| Baixa CFA | 120 | 2.3 \pm 2.1 | 116 | 2.1 \pm 2.17 | 46 | 0.9 \pm 1.1 |
| Valor p | | 0.000 | | 0.000 | | 0.000 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.01$.

A porcentagem de Blastocistos produzidos em relação ao número de oócitos cultivados, bem como a porcentagem de prenhez de receptoras em relação ao número de embriões transferidos, também foram superiores no grupo de alta CFA. A proporção de embriões transferidos em relação ao total de embriões produzidos foi a mesma entre os dois grupos (Tabela 03).

Tabela 3. Número total e porcentagem de blastocistos (BI) no D7 em relação ao número de oócitos cultivados; número total e porcentagem de BI transferidos em relação ao número de BI total D7 de vacas da raça Girolando com alta CFA (35-52 folículos) e baixa CFA (11-17 folículos); e número total e porcentagem de prenhez nas receptoras destes embriões.

| Grupo | BI total D7 (n) | % BI total/ oócitos cultivados | BI transferidos (n) | % BI transferidos/ BI total D7 | Prenhez (n) | % prenhez/ BI transferidos |
|-----------|-----------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|----------------------------|
| Alta CFA | 394 | 23.0 | 328 | 83.2 | 140 | 42.7 |
| Baixa CFA | 120 | 18.4 | 116 | 86.7 | 46 | 39.7 |
| Valor p | | 0.037 | | 0.180 | | 0.048 |

Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.05$.

Discussão

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que aborda os resultados da PIVE de bovinos mestiços *Bos indicus* x *Bos taurus* com aptidão leiteira de acordo com sua contagem de folículos antrais. No entanto, diversos trabalhos buscaram relacionar a CFA e o desempenho reprodutivo em outras espécies ou em outras biotécnicas.

Os resultados desse trabalho mostraram maior eficiência de fêmeas com alta CFA (35-52 folículos) quando comparadas às fêmeas de baixa (11-17 folículos) em todos os parâmetros avaliados. O número médio de oócitos recuperados e de embriões produzidos *in vitro* foram maiores no grupo de alta CFA ($42,64 \pm 5,24$ e $38,12 \pm 6,58$) em relação ao grupo de baixa CFA ($14,62 \pm 1,91$ e $12,30 \pm 2,79$). Assim sendo, essa característica foi positivamente associada às variáveis quantitativas estando de acordo com os resultados obtidos por Silva-Santos et al. (2014b), que recuperaram em média $36,90 \pm 13,68$ oócitos no grupo de animais com alta CFA e $5,80 \pm 3,40$ em animais com baixa CFA, da raça Braford (3/8 *indicus* e 5/8 *taurus*). O mesmo comportamento também foi observado em animais da raça Nelore (PONTES et al., 2011).

Independentemente da classificação dos animais quanto à contagem dos folículos antrais, Baldrighi et al. (2014), encontraram um número médio de 60 oócitos em novilhas Gir e 35,9 oócitos em novilhas Holandesas. Esses resultados evidenciam a diferença entre a quantidade de folículos ovarianos *Bos indicus* e *Bos taurus*, conforme destacado por outros pesquisadores (GIMENES et al., 2010).

Da mesma forma, no presente estudo, as taxas de blastocistos foram maiores nas fêmeas de alta CFA ($23,38 \pm 15,11$) em comparação com as de baixa CFA ($17,77 \pm 16,92$). Esses índices reforçam os obtidos por Silva-Santos et al. (2014b), ao avaliarem vacas mestiças com aptidão para corte. Embora esses autores não tenham observado diferença significativa entre os grupos, provavelmente em função de um número amostral menor ($n = 122$ embriões no grupo de alta CFA; $n = 11$ embriões grupo de baixa CFA), a relação obtida entre as taxas de blastocistos dos grupos alta e baixa CFA (16,53% vs. 9,48%) foi de 1,7, próxima à relação de 1,3 obtida neste trabalho. Esse resultado evidencia o melhor potencial de desenvolvimento *in vitro* dos embriões originados de fêmeas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* com maior quantidade de folículos. A vantagem de fêmeas com alta CFA na produção de embriões também estão de acordo com estudos em animais *Bos indicus* (SANTOS et al., 2016), entretanto, divergem do trabalho realizado por Ireland et al. (2007), que não observaram efeito da CFA na produção de embriões (30,9% e 29,6%) em vacas de origem *Bos taurus*, provavelmente em função das diferenças entre as raças estudadas.

Existem evidências de que a qualidade do oócito e a aquisição de competência para fecundação são fatores fundamentais para a fertilidade da fêmea, refletindo diretamente na taxa de desenvolvimento embrionário, no índice de prenhez (LONERGAN et al., 2001) e conseqüentemente no sucesso reprodutivo do rebanho, e que o ambiente folicular é de relevante importância, visto que, diferentes perfis hormonais, podem alterar o número de oócitos morfológicamente saudáveis (EVANS et al., 2012).

Considerando que menores níveis de FSH e maiores concentrações de estradiol (IRELAND et al., 2009), de hormônio anti-Mülleriano (AMH; BARUSELLI et al., 2015) e de progesterona (MARTINEZ et al., 2016) estão diretamente relacionados com o maior número de folículos antrais e de oócitos saudáveis, pode-se propor que os embriões originados de vacas com alta CFA, neste estudo, apresentaram maior potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*, provavelmente pelo fato de que essas fêmeas possuem ambiente folicular mais favorável ao desenvolvimento oocitário. O melhor ambiente folicular também pode estar refletindo o maior número de oócitos viáveis observado em os animais com alta CFA (Tabela 01).

Embora taxa de prenhez deva ser cuidadosamente analisada, uma vez que sempre há o efeito do touro e da receptora, que podem interferir nos resultados, esse parâmetro é de grande importância para avaliar a eficiência das técnicas da reprodução. Nesse estudo obteve-se maiores índices de prenhez a partir dos embriões *in vitro* provenientes de fêmeas com alta CFA, indicando que embriões *in vitro*, dessas doadoras apresentaram maior potencial de desenvolvimento. Esses resultados estão de acordo com Pontes et al. (2011), que obtiveram taxa de prenhez seis vezes maiores para embriões produzidos *in vitro*, de fêmeas Nelore com alta CFA.

Pesquisas com animais *Bos taurus* tem mostrado resultados semelhantes na utilização de Inseminação Artificial e estabelecem claramente uma relação positiva entre CFA e importantes aspectos relacionados à eficiência reprodutiva (MOSSA et al., 2012; MARTINEZ et al., 2016).

No entanto, deve-se estar atento às diferenças metodológicas aplicadas nos estudos, principalmente com relação a técnica aplicada e a raça avaliada. Nesse contexto, é importante considerar que trabalhos com animais *Bos indicus*, classificados de acordo com a CFA e submetidos à IATF, apresentaram resultados controversos, verificando que a população de folículos antrais não influenciou as taxas de prenhez (MOROTTI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; SANTOS et al., 2016), ou que fêmeas com baixa CFA apresentaram taxas de concepção superiores quando comparadas com fêmeas de média e alta (MORETTI, 2016). Entretanto, é importante ressaltar que as taxas de prenhez nesses estudos foram obtidas a partir de embriões fecundados *in vivo*.

Essas divergências na taxa de prenhez observadas entre os estudos, podem ser devidas às diferenças existentes entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Embriões *in vitro* são considerados mais sensíveis, pois possuem maior quantidade de vacúolos, menor número de células totais (CROSIER et al., 2001; DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013), além de diferentes perfis lipídico e proteico (SUDANO et al., 2013). Portanto, pode-se supor que a influência da CFA na qualidade de oócitos e competência de desenvolvimento embrionário, tornam-se mais evidentes em embriões produzidos *in vitro*, justificando as diferentes taxas de prenhez entre os grupos.

Conclusões

Pode-se concluir que fêmeas *B. indicus* x *B. taurus*, da raça Girolando com alta CFA apresentaram melhores taxas de produção *in vitro* de embriões.

Receptoras de embriões produzidos *in vitro* de vacas da raça Girolando com alta CFA apresentaram maiores índices de prenhez.

Além disso, a seleção de doadoras de oócitos com alta CFA da raça Girolando, mediante avaliação por ultrassonografia, é um método preciso para estimar a produção *in vitro* de embriões.

Referências

- Baldrighi JM, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli OS, Assumpção MEOA. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reprod Dom Anim* 2014; 49:1015–1020.
- Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*, 2015; 12: 487-497.
- Campos H. Estatística experimental não-paramétrica. 4.ed. Piracicaba: ESALQ, 1983. 349 p.
- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced *In vivo* or *In vitro*. *Biology of reproduction*, 2001, 64:1375-1385.
- Dell Statistics (data analysis software system), version 13. <software.dell.com>.
- Dode MAN, Leme LO, Sprícigo JFW. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Rev Brasil Reprod Anim*, 2013; 37:145-150.
- Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Ireland JJ. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest Anim* 2012; 47:31-37.
- Gimenes LU, Ferraz ML, Araujo AB, Fantinato Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Arango JSP, Raposo M, Souza DC, Calomeni GD, Gardinal R, Rodriguez C, Meirelles FV, Baruselli PS. 2010. OPU at different times of a synchronized follicular wave did not affect IVP in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*. 36th International Embryo Transfer Society Annual Conference, Vol. 22. *Reproduction, Fertility and Development*, Cordoba, Argentina, pp. 293.

Ireland JJ, Zielak-Steciwko AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettegowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Kight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans AC, Lonergan P. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of reproduction*, 2009; 80:954-964.

IETS - sociedade internacional de transferência de embriões. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Illinois: IETS, 1998. 180p.

Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 2001; 41:427-37.

Martinez MF, Sanderson N, Quirke LD, Lawrence SB, Juengel JL. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 2016; 85:466-475.

Moretti R. Influência da contagem de folículos antrais sobre as taxas de concepção e prenhez em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à sincronização da ovulação. 2016. 28f. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes: Produção animal) - Universidade do Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2016.

Morotti F, Santos GMG, Silva-Santos KSS, Moritz Y, Marcantonio TN, Seneda MM. Follicular dynamics in Nelore females (*Bos indicus*) with high or low numbers of antral follicles. *Animal Reproduction*, 2014; 11:352-352.

Mossa F, Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Madeddu M, Bebbere D, Naitana S. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances *in vitro* embryo yield in sheep. *Anim Reprod Sci*. 2008; 109:134-45.

Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 2012; 95:2355–2361.

Pinheiro VG, Ereno RL, Razza EM, Barros CM, Nogueira MF. Is the low number of ovarian antral follicles ≥ 3 mm in diameter associated with low fertility in lactating nelore cows? *Reproduction, Fertility and Development*. 2015; 27:99-100.

Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; 75:1640–6.

Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010; 74:1349–1355.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*. 2009; 71:690-697.

Rodrigues AS, Oliveira SN, Loiola MVG, Ferraz PA, Chalhoub M, Bittencourt RF, Araujo EAB, Bittencourt TCBSC, de Lisboa Ribeiro Filho, A. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Ciência Rural*. 2015; 45:711-717.

Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Blaschi W, Morotti F, Silva CB, Moraes FLZ, Giudicissi DPL, Seneda MM. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim Reprod*, 2013; 10:451

Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches, BV, Moraes FLZ, Blaschi W, Seneda MM. 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* 2016; 165:17-21.

Seneda MM, Esper CR, Gacia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 2003; 59:1435–40.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* 2001; 67:37-43.

Silva-Santos KC, Ferreira CR, Santos GM, Eberlin MN, Siloto LS, Rosa CO, Marcantonio TN, Seneda MM. MALDI-MS lipid profiles of oocytes recovered by ovum pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* with high vs low oocyte yields. *Reprod Domest Anim*. 2014A; 49:711-8.

Silva-Santos KC, Santos GM, Koetz Junior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DCM, Seneda MM. Antral Follicle Populations and Embryo Production – *In vitro* and *In vivo* – of *Bos indicus-taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. *Reprod Dom Anim* 2014B; 49:228–232.

Sudano MJ, Paschoal DM, Maziero RRD, Rascado TS, Guastali MD, Crocomo LF, Landim-Alvarenga FDC. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Animal Reproduction*. 2013, 10:160-167

7 DISCUSSÃO GERAL

Embora o rebanho bovino brasileiro seja constituído por grande variedade de raças, tanto taurinas como zebuínas, foi graças à capacidade de adaptação ao ambiente tropical que o segundo tipo racial encontrou condições adequadas para se multiplicar. Visando obter animais que possuíssem elevada capacidade produtiva e longevidade, aliada à rusticidade exigida pelas condições do clima tropical, produtores de leite iniciaram, entre os anos de 1940 e 1950, os primeiros cruzamentos entre as raças Gir e Holandesa, originando a raça Girolando (5/8 Holandês + 3/8 Gir). Animais Girolando, melhorados geneticamente, caracterizam-se por apresentar alta produção de leite, herdada de animais *Bos taurus*, e maior rusticidade e população folicular, herdada de animais *Bos indicus*, e atualmente representam a maioria do rebanho leiteiro nacional.

Os trabalhos de melhoramento genético nos rebanhos baseavam-se principalmente nas técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões; mas, nos últimos anos, a utilização da técnica de OPU/PIVE vem ganhando destaque entre as biotécnicas da reprodução animal, e tem contribuído significativamente na multiplicação e seleção desses animais. O Brasil é o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo, e esse sucesso deve-se aos avanços na pesquisa e ao potencial do rebanho bovino nacional.

Muitos estudos apontam que a população de folículos antrais ovarianos é altamente variável entre as fêmeas, mas muito estável no mesmo indivíduo, e que está diretamente relacionada com a fertilidade do rebanho, qualidade oocitária e, conseqüentemente, à produção de embriões e taxa de prenhez. Entretanto, os resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa são altamente controversos, reforçando que, ao estabelecer uma comparação entre diversos estudos, é de relevante importância considerar outros aspectos que podem interferir no desempenho reprodutivo, tais como, subespécies (*B. indicus* x *B. taurus*), aptidão de produção (leite vs. corte), idade da fêmea, variabilidade da CFA entre indivíduos, critério de classificação dos grupos experimentais em relação a PFA, práticas de manejo, fatores ambientais e a biotecnologia da reprodução utilizada.

Compreender os mecanismos fisiológicos e a influência da PFA sobre a fertilidade é de grande interesse para o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida e para o desenvolvimento de alternativas que otimizem a produtividade do

rebanho.

Nesse contexto, o primeiro estudo avaliou a influência da população folicular antral sobre o potencial de produção *in vitro* de embriões de fêmeas da raça Nelore, submetidas a cinco aspirações foliculares, realizadas após sincronização de onda, o que permitiu uma CFA altamente precisa. Os números médios de oócitos/OPU recuperados foram $30,1 \pm 14,9$ para o grupo com alta CFA, e $7,9 \pm 3,8$ para o grupo com baixa ($p < 0,01$). Foi observada porcentagem de clivagem semelhante para os grupos com alta e baixa CFA (80,4% e 75,6% respectivamente, $p < 0,01$), e maiores taxas de blastocistos/oócitos cultivados de vacas com alta CFA (39,8% no dia 7 e 41,8% no dia 10; $p < 0,01$), quando comparadas com vacas de baixa CFA (26,1% e 29,0%; $p < 0,01$). Os resultados obtidos sugerem que fêmeas com alta CFA são capazes de produzir embriões com maior potencial de desenvolvimento *in vitro*.

Deve-se destacar que o principal diferencial deste estudo reside no rigor metodológico utilizado nos animais em campo, tendo em vista a padronização de procedimentos, tais como: repetições das OPU, sincronização de ondas foliculares das doadoras e avaliação da CFA, o que tornou as análises e conclusões mais consistentes, quando comparadas com outros resultados.

O segundo estudo analisou a influência da população folicular antral sobre os índices de produção *in vitro* de embriões, e prenhez de fêmeas da raça Girolando, submetidas a 3-5 aspirações foliculares. Este é, até o momento, o primeiro trabalho que aborda os resultados da PIVE em bovinos mestiços *B. indicus* x *B. taurus* para a produção de leite, de acordo com sua contagem de folículos antrais.

O número médio de oócitos recuperados e de blastocistos produzidos *in vitro* por OPU, foram significativamente maiores no grupo de alta CFA ($42,6 \pm 5,2$ e $38,1 \pm 6,6$; $p < 0,01$) do que no grupo de baixa CFA ($14,6 \pm 1,9$ e $12,3 \pm 2,8$; $p < 0,01$). Esses resultados evidenciam a diferença da população de folículos ovarianos entre animais de diferentes raças (*Bos indicus*, *Bos taurus* e cruzados), conforme destacado por muitos pesquisadores. No presente estudo, as taxas de blastocisto em relação ao número de oócitos cultivados e prenhez em relação ao número de blastocistos transferidos, mostrou um maior potencial de desenvolvimento dos embriões originados de vacas com maior população folicular.

Uma hipótese que poderia explicar essa superioridade na produção *in vitro* de embriões seria a existência de um melhor ambiente folicular em ovários com maior quantidade de folículos em crescimento. Sabe-se que o ambiente folicular

influencia diretamente o potencial de desenvolvimento do oócito, e que concentrações séricas de FSH, estradiol, AMH, progesterona, expressão de mRNA e composição lipídica podem alterar o número de oócitos morfológicamente saudáveis. Considerando que o sucesso da PIVE depende diretamente da recuperação de oócitos de boa qualidade, capazes de adquirir competência para fecundação acredita-se que um ambiente folicular mais rico favoreça o desenvolvimento de oócitos com maior capacidade para o desenvolvimento *in vitro*. Também é importante considerar as diferenças existentes entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*.

A contribuição dos estudos apresentados foi mostrar que animais com maior quantidade de folículos antrais respondem melhor à técnica de PIVE. Além disso, a CFA é ferramenta confiável, capaz de supor o potencial reprodutivo do animal e auxiliar na seleção de doadoras com alta capacidade de produção de embriões.

8 CONCLUSÕES

Fêmeas com alta CFA, das raças Nelore (*B. indicus*) e Girolando (*B. indicus* x *B. taurus*) apresentaram melhores taxas de produção de embriões *in vitro* do que animais com baixa CFA.

Taxa de prenhez mais alta foi obtida a partir de embriões produzidos *in vitro* provenientes de fêmeas Girolando com alta contagem de folículos antrais.

A seleção de doadoras de oócitos com alta CFA das raças Nelore e Girolando, mediante avaliação por ultrassonografia, é um método preciso para estimar a produção *in vitro* de embriões.