



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ENTRE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) DE ALTA VS. MÉDIA
VS. BAIXA QUANTIDADE DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ENTRE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) DE ALTA *VS.* MÉDIA
VS. BAIXA QUANTIDADE DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R788c Rosa, Camila Oliveira.

Comparação da produção *in vitro* de embriões entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) de alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais / Camila Oliveira Rosa. – Londrina, 2015.
66 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.

Inclui bibliografia.

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

CDU 636.082.4

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ENTRE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) DE ALTA *VS.* MÉDIA *VS.*
BAIXA QUANTIDADE DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina, 11 de Fevereiro de 2015.

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

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

DEDICATÓRIA

À Deus.

A minha eterna e amada avó Helena.

Aos meus pais Romaldo e Marilena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me permitido chegar até aqui e alcançar algo que um dia já considere inatingível. Nada é impossível se colocarmos nas mãos Dele!! Pelas bênçãos recebidas, por nunca me deixar desistir e sempre me mostrar uma luz no meio da escuridão, conduzindo-me sempre pelo melhor caminho, não me deixando esmorecer nos momentos de desespero. Pelos desafios e obstáculos encontrados no meio do percurso, pois com eles eu amadureci não só profissionalmente, mas principalmente como pessoa. Por me dar forças para aguentar a saudade da minha família, mesmo quando a vontade era de largar tudo e voltar correndo para casa.

Agradeço aos meus pais Romaldo e Marilena por tornarem essa conquista possível, não só financeiramente, mas pelo apoio incondicional. Eles que não tiveram a oportunidade que eu tive de estudos, mas que mesmo assim nunca mediram esforços para minha formação, sempre me incentivando a sonhar cada vez mais alto. Por serem meus exemplos de humildade, perseverança, amor e determinação. A minha mãe por sempre fazer dos meus sonhos os seus, pelas repetidas palavras de apoio nos momentos decisivos: -“Filha, você nasceu para vencer, fica tranquila que tudo vai dar certo e a mamãe ama você!”. Essa vitória não é só minha, é NOSSA!!!

A minha eterna e amada avó Helena, que sempre me apoiava e vibrava com as minhas vitórias, se cheguei “aqui” devo muito a ela. A qual sempre foi fundamental em minha vida, meu exemplo de garra e determinação. Aquela que se entusiasmava escutando eu explicar o que estava aprendendo e fazendo, mesmo não entendendo muita coisa do que eu dizia. Obrigada pela nossa relação de muito amor, amizade e cumplicidade. Não existem palavras para expressar quão grande é meu amor, minha gratidão e principalmente a minha saudade!!

Ao meu namorado Kyoshi, meu porto seguro, que foi fundamental na minha trajetória até aqui, sempre me direcionando para o melhor caminho e me apoiando nas minhas decisões. Obrigada por ficar ao meu lado nos meus momentos de desespero, pelos conselhos e “sermões”. Por me ajudar a seguir em frente e aprender a confiar mais em mim. Por esses sete anos de muito companheirismo e amor!! Agradeço a Deus por ter o colocado na minha vida.

Agradeço ao meu querido orientador Prof Dr. Marcelo Seneda, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da pesquisa, sempre sendo exemplo de profissionalismo. Pelos momentos não só de orientação acadêmica, mas pessoal. Pela compreensão e amizade nos momentos difíceis que passei. Ser orientada por ele, com certeza torna tudo mais simples e prazeroso.

Agradeço aos meus irmãos Diego e Carina, que sempre me incentivam, apoiam e torcem pelas minhas conquistas. Por entenderem a minha ausência em muitos momentos, por fazerem “a minha parte” e por tentarem esconder de mim as preocupações quando estou longe. A nossa caçula e meu bebê Laura, o amor mais puro e verdadeiro, que torna os meus dias mais felizes e me mostra quão maravilhosa é a vida com um simples sorriso.

Aos meus sobrinhos Maria e Lorenzo, pelo amor incondicional e carinho, me dando forças para seguir em frente. A Licieli, que as adversidades da vida nos distanciaram, mas que faz parte dessa conquista e me apoiou muito nessa jornada. Agradeço também a todos os meus familiares que de uma forma ou outra colaboraram comigo nesta luta.

À todos os meus amigos do Laboratório REPROA: Andressa, Bruno, Camila C., Camila B., Eleni, Fábio, Fabiana, Fernanda, Isabela, João, Larissa, Luciana, Marilu, Paula, Polyana, Roberta e Suellen. Em especial a aqueles que ajudaram durante a execução do meu trabalho, sem a ajuda de vocês não seria possível, todos foram muito importantes e serei eternamente grata por isso!! A Kátia e Gustavo, não poderia deixar de agradecer essas duas

peessoas que foram fundamentais para que eu ingressasse no mestrado e que também colaboraram para que esse trabalho fosse possível.

À minha amiga Hanna, a qual morou comigo durante o mestrado, que esteve ao meu lado em todos os momentos desta minha caminhada e que me amparou sempre que precisei. À minha amiga Juliana que também sempre esteve comigo e me ajudou a suportar a saudade de casa. Também não posso deixar de agradecer minha amiga Marina, que mesmo longe torna meus dias mais divertidos.

As minhas amigas de Imbituva, que desde a infância fazem parte das minhas conquistas, Amanda, Bruna, Camila B., Ethel, Emily, Karen, Kamylla e Natalli. Com certeza o apoio de vocês fazem toda a diferença.

Aos amigos que Londrina me trouxe, meus amigos da residência de grandes animais, Natalia e José Guilherme. Agradeço aos meus colegas de mestrado, em especial minha amiga Mariana a qual esteve sempre ao meu lado. Pelos momentos de companheirismo, sejam eles em horas boas ou ruins.

Agradeço aos membros da banca de qualificação (Profa. Dra. Lívia Lisboa e Profa. Dra. Kátia Silva Santos) pelas importantes contribuições para este trabalho. E aos membros da banca de defesa (Profa. Dra. Fernanda Landim e Prof. Dr. Thales Barreiros) por aceitarem participar deste momento importante de minha carreira e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

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

À empresa In Vitro Brasil S/A pela disponibilização dos meios utilizados para a produção dos embriões, tornando essa pesquisa possível.

Enfim, agradeço a todos que de uma maneira ou outra fazem parte dessa conquista, e que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho. À todos meu muito obrigada, que Deus abençoe vocês!!

“Se as coisas são inatingíveis, ora! Não é
motivo para não querê-las.
Que tristes seriam os caminhos se não fora a
presença distante das estrelas.”

MÁRIO QUINTANA

RESUMO

ROSA, Camila Oliveira. **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.

Com o objetivo de comparar a produção *in vitro* de embriões a partir, de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta, média e baixa população de folículos antrais, ovários foram obtidos aos pares em abatedouro local e transportados até o laboratório. Para a quantificação da média da população folicular antral obteve-se ovários (n=336) de 168 fêmeas Nelore. A classificação dos grupos foi definida utilizando a média \pm desvio padrão, em G-Alta (≥ 92 folículos), G-Média (46-76 folículos) e G-Baixa (≤ 31 folículos). Para a produção *in vitro* de embriões foram utilizados 752 ovários de 356 animais em 9 réplicas. Após obtenção, os ovários coletados foram levados ao laboratório para classificação nos grupos experimentais (alta, média e baixa) e recuperação oocitária. A quantidade de oócitos (n=15) por gota de meio e a quantidade de oócitos cultivados por grupo em cada réplica foram padronizadas. A produção *in vitro* de embriões foi comparada a partir das taxas de clivagem, blastocisto e eclosão. A análise estatística foi feita pelo teste de regressão logística utilizando o pacote estatístico Car do software "R" e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. As taxas de clivagem e blastocisto não diferiram entre os grupos, sendo respectivamente, 76,6% e 40,6% em G-Alta (n= 617 oócitos), 77,5% e 36,3% em G-Média (n= 590 oócitos), e 79,5% e 38,6% em G-Baixa (n= 536 oócitos). A taxa de eclosão foi superior em G-Alta (16,5%) em comparação ao G-Média (11,5%; $p = 0.0129$) e G-Baixa (11,6%; $p = 0.0179$). A população de folículos antrais não demonstrou influência na produção *in vitro* de embriões, porém, fêmeas Nelore com alta contagem de folículos antrais (≥ 92) influenciaram positivamente a taxa de eclosão *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: *Bos indicus*, contagem de folículos antrais, Nelore e produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

Rosa, Camila Oliveira. **Comparison of *in vitro* production between female Nelore (*Bos indicus*) embryos with high vs. medium vs. low quantity of antral follicles.** 2015. 66f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - University State of Londrina. Londrina. 2015.

In order to compare the *in vitro* production of embryos from Nelore females (*Bos indicus*) with high, medium and low population of antral follicles, ovaries were obtained in pairs at a local slaughterhouse and transported to the laboratory. To quantify the average antral follicular population, ovaries (n=336) were obtained from 168 Nelore females. The groups classification was defined using the average \pm standard deviation, in G-high (follicles ≥ 92), G-Medium (46-76 follicles) and G-Low (≤ 31 follicles). To produce *in vitro* embryos, 752 ovaries from 356 animals in 9 replicates were used. After obtaining, the collected ovaries were taken to the laboratory for classification in the experimental groups (high, medium and low) and oocyte recovery. The number of oocytes (n=15) per drop of medium and the amount of cultured oocytes per group in each replicate were standardized. The *in vitro* production of embryos was compared from the cleavage, blastocyst and hatching rates. The statistical analysis was performed through the logistic regression test using the statistical package Car from the software "R" and the differences were considered significant if $p < 0.05$. The cleavage and blastocyst rates did not differ between the groups, respectively, 76.6% and 40.6% in G-High (n=617 oocytes), 77.5% and 36.3% in G-Medium (n=590 oocytes) and 79.5% and 38.6% for G-Low (n=536 oocytes). The hatching rate was higher in G-High (16.5%) compared to the G-Medium (11.5%; $p=0.0129$) and the G-Low (11.6%; $p=0.0179$). The population of antral follicles did not influence the *in vitro* production of embryos, however, Nelore females with high score of antral follicles (≥ 92) influenced positively the *in vitro* hatching rate of embryos.

Keywords: *Bos indicus*, antral follicle count, Nelore, *in vitro* production of embryos.

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1** Distribuição das fêmeas Nelore (*Bos indicus*; n=168) de acordo com a média da contagem visual de folículos antrais considerando o par de ovários..... 39

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Taxas de clivagem, blastocisto e eclosão na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos utilizando-se oócitos provenientes de vacas Nelore de alta, média e baixa contagem de folículos antrais.....	42
---------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMH - Hormônio Anti-Mulleriano
- BSA - Albumina sérica bovina
- CCOs - *Complexo Cumulus Oophorus*
- CFA - Contagem de folículos antrais
- CIV - Cultivo *in vitro*
- CL - Corpo lúteo
- D - Dia
- FIV - Fecundação *in vitro*
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- HEPES - N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
- IA - Inseminação artificial
- IATF - Inseminação artificial em tempo fixo
- MIV - Maturação *in vitro*
- mg - Miligramas
- mL - Mililitros
- mm - Milímetros
- mM - Milimolar
- OPU - Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia
- PFA - População folicular antral
- PHE - Penicilamina, epinefrina e hipotaurina
- PIV - Produzidos *in vitro*
- PIVE - Produção *in vitro* de embriões
- SFB - Soro fetal bovino
- μL - microlitros
- °C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 FOLICULOGÊNESE.....	18
2.2 INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL.....	19
2.3 DIFERENÇAS ENTRE ANIMAIS <i>BOS TAURUS</i> VS. <i>BOS INDICUS</i>	21
2.4 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	24
REFERÊNCIAS	26
3. HIPÓTESE.....	33
4. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 <i>Animais</i>	38
2.2 <i>Classificação dos animais pela contagem de folículos antrais</i>	38
2.3 <i>Recuperação oocitária</i>	39
2.4 <i>Maturação in vitro (MIV)</i>	40
2.5 <i>Fecundação in vitro (FIV)</i>	40
2.6 <i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	41
2.7 <i>Análise estatística</i>	42
3. RESULTADOS.....	42
4. DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	47

6. CONCLUSÕES.....	50
7. ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial absoluto na produção *in vitro* de embriões bovinos, apontado como referência em outros países, e sendo responsável por 85% da produção mundial de embriões *in vitro* (Stroud, 2012; IETS, 2013). Esta biotécnica teve um crescimento significativo nos últimos anos, e tem sido um poderoso instrumento para a multiplicação e disseminação de genética de alta qualidade.

Segundo dados da ABIEC (2013), o Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, e em média de 80% - 85% constituído de animais da raça Nelore (*Bos indicus*). Este destaque do país na produção *in vitro* de embriões possui relação direta com o número de folículos e oócitos obtidos de fêmeas *Bos indicus*. Estudos demonstraram recuperação de oócitos superior em relação a de fêmeas *Bos taurus* e conseqüentemente uma maior produção embrionária (Pontes et al., 2009; 2011).

Buscando averiguar a possível influência da população folicular e a fertilidade em bovinos, Ireland et al. (2011) constataram que fêmeas com baixa contagem de folículos antrais (≤ 15 folículos antrais), possuem inúmeros aspectos geralmente associados à fertilidade reduzida, como maior quantidade de marcadores relacionados à baixa qualidade oocitária (Ireland et al., 2009) e menor taxa de prenhez na inseminação artificial (Cushman et al., 2009) em vacas mestiças de corte.

Em fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*) a infertilidade em fêmeas com baixa CFA já está bem estabelecida. Mossa et al. (2012) relataram que fêmeas Holandesas (*Bos taurus*) com baixo número de folículos antrais (≤ 15 folículos) nos ovários possuem taxas mais baixas de prenhez (84% vs 94%), maior intervalo entre partos (114 vs 100 dias) e maior número de serviços por prenhez (2,7 vs 2,4) em comparação com as fêmeas com maior número de folículos antrais (≥ 25 folículos).

1 Na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões, foi relatada uma influência positiva em
2 fêmeas Braford (*Bos indicus-taurus*; Silva-Santos et al., 2014a). Porém, dados sobre a
3 influência da PFA na PIVE de fêmeas Nelore são escassos. Tendo em vista, que as diferenças
4 na fisiologia dos animais *Bos taurus* e *Bos indicus* devem ser levadas em consideração no
5 emprego das biotécnicas reprodutivas (Baruselli et al., 2007; Pontes et al., 2010), resultados
6 distintos aos relatados podem ser encontrados em fêmeas zebuínas.

7 Diante deste quadro, são necessários estudos para colaborar com a investigação da
8 influencia da CFA na fertilidade de fêmeas *Bos indicus*. Desta forma, compreender as
9 implicações da população folicular antral sobre a fertilidade poderá permitir uma associação
10 deste parâmetro com diferentes biotecnologias da reprodução, maximizando os índices
11 reprodutivos. O objetivo do presente estudo foi comparar a produção e eclosão *in vitro* de
12 embriões na raça Nelore, a partir de ovários obtidos de abatedouros de fêmeas de alta, média
13 ou baixa contagem de folículos antrais.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é um processo fisiológico de formação folicular, que inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro, também denominado folículo pré-ovulatório ou folículo de *De Graaf* (Saumande, 1981). Processo que acontece simultaneamente ao crescimento e diferenciação do oócito e da camada de células da granulosa (Adams; Jaiswal, 2008).

Os folículos são classificados em pré-antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios). O folículo é a estrutura primordial do ovário e é composto por um oócito envolto por uma ou mais camadas de células somáticas, dependendo do estágio de desenvolvimento, apresenta zona pelúcida e cavidade antral preenchida por líquido folicular (Figueiredo et al., 2002; Seneda et al., 2008; Aerts; Bols, 2010).

O desenvolvimento do folículo primordial para folículo primário é caracterizado pela ativação e crescimento do folículo, que se encontra em quiescência desde o período fetal, ocorrendo a proliferação e diferenciação das células da granulosa, em células cubóides (Hulshof et al., 1994). Para a formação do folículo secundário acontece o aumento do tamanho do oócito, a caracterização da zona pelúcida, presença das primeiras células da teca (Van den Hurk et al., 2000) e aumento do número de camadas das células da granulosa (Hulshof et al., 1994). Ao fim deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada (Van Den Hurk et al., 2000).

Com o crescimento folicular, há a formação da cavidade antral (Adams; Jaiswal, 2008; Aerts; Bols, 2010). Os folículos antrais incluem os folículos terciários e pré-ovulatórios, possuem um oócito circundado pela zona pelúcida, envolto pela corona radiata e pelas células

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

4 Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é dependente
5 da ação de gonadotrofinas (Seneda et al., 2010), atuando por meio de mecanismos parácrinos
6 e endócrinos (Ginther et al., 2001; Fortune et al., 2004;).

7

8 2.2 INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL

9

10 A população de folículos antrais (PFA) possui grande variabilidade individual, mas a
11 contagem de folículos antrais (CFA) possui alta repetibilidade no mesmo indivíduo,
12 independente do dia do ciclo estral, da idade, da raça, do estágio de lactação ou da época do
13 ano (Ireland et al., 2007, 2008;. Jimenez-Krassel et al., 2009; Silva-Santos et al., 2014c). A
14 raça ou subespécie pode exercer grande influência na CFA, principalmente quando se
15 compara *Bos taurus* e *Bos indicus* (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007).

16 A CFA deve incluir todos os folículos ≥ 3 milímetros de diâmetro em ambos os ovários
17 (Evans et al., 2012). O ultrassom pode ser utilizado de forma segura durante ondas foliculares
18 para identificar a população folicular antral em vacas taurinas (Holandesa), mestiças e
19 zebuínas (Nelore; Burns et al., 2005; Silva-Santos et al., 2014c). Entretanto, de acordo com o
20 que inferem Fitzpatrick; Entwistle, (1997), a contagem visual dos folículos em fêmeas *Bos*
21 *taurus* possui uma alta correlação positiva ($r=0,79$) com a população real de folículos antrais
22 nos ovários (Ireland et al., 2007; Cushmann et al., 2009).

23 Muitos trabalhos sugerem que a PFA afeta uma variedade de aspectos reprodutivos,
24 acabando por impactar direta ou indiretamente na fertilidade em bovinos (Ireland et al., 2008;
25 Jimenez-Krassel et al., 2009; Santos et al., 2012).

1 A influência da PFA em vacas Holandesas (*Bos taurus*) está bem estabelecida em
2 alguns aspectos. Vacas com baixa CFA (≤ 15 folículos) possuem características relacionadas à
3 baixa fertilidade, como os ovários pequenos (Ireland et al., 2008), menor taxa de prenhez na
4 inseminação artificial (IA; Mossa et al., 2012), menor responsividade à superovulação
5 (Ireland et al., 2007), reduzida espessura endometrial (dia 0 ao dia 6 do ciclo estral) e
6 concentração de progesterona (dia 0 a 12 do ciclo estral; Jimenez-Krassel et al., 2009), e
7 maior quantidade de marcadores (Catepsina B e S) de células do *cumulus* associado à baixa
8 qualidade do oócito (Ireland et al., 2009).

9 Um estudo recente em vacas da raça Holandesa e Jersey (*Bos taurus*) com baixa CFA
10 (< 20 folículos), demonstraram menor taxa de concepção à primeira IA (45,2 vs. 66,5%)
11 comparadas a vacas de alta CFA (> 30 folículos; Martinez et al., 2013). Resultados
12 semelhantes foram obtidos em novilhas mestiças de corte (*Bos indicus-aurus*) com baixa
13 CFA (≤ 15 folículos), de ovários obtidos de abatedouro e classificados pela contagem visual
14 dos folículos (Cushmann et al., 2009).

15 Em fêmeas Braford (*Bos indicus-aurus*) aos 24 meses, a CFA foi correlacionada
16 positivamente à resposta superovulatória, a produção *in vivo* de embriões foi maior em fêmeas
17 com alta CFA (≥ 40 folículos) em relação à de baixa CFA (≤ 10 folículos; Silva-Santos et al.,
18 2014a). A mesma influencia foi encontrada em vacas de corte (*Bos taurus*) com baixa CFA
19 (≤ 15) e alta CFA (≥ 25 ; Ireland et al., 2007).

20 A PFA também esta positivamente correlacionada com a concentração de AMH no
21 plasma em novilhas Nelore (*Bos indicus*) e novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*; Batista et
22 al., 2014), o AMH é produzido exclusivamente por células da granulosa de folículos
23 saudáveis em desenvolvimento (La Marca; Volpe, 2006).

24 A baixa CFA associada com a redução da fertilidade também já foi relatada em seres
25 humanos (Baerwald et al., 2003). Entretanto, em fêmeas Nelore com alta (≥ 53 folículos),

1 intermediária (34-53) e baixa CFA (≤ 34), não foi encontrada influência da PFA sobre a taxa
2 de concepção à IATF (29,27% vs 29,33% vs 29,34%), respectivamente (Rodrigues et al.,
3 2013).

4 Trabalhos recentes não encontraram diferenças no perfil lipídico de oócitos, em
5 fêmeas *Bos indicus* e *Bos indicus-taurus* com alta (≥ 30) e baixa (≤ 15) CFA (Silva-Santos et
6 al., 2014d). Também não foi encontrada correlação entre folículos pré-antrais e antrais, em
7 fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta (≥ 57) e baixa (≤ 21) CFA, e em fêmeas Aberdeen Angus
8 (*Bos taurus*) com alta (≥ 45) e baixa (≤ 13) CFA (Silva-Santos et al., 2014b).

9 A influência da CFA em fêmeas *Bos taurus* já foi bem investigada, porém, trabalhos
10 com fêmeas Nelore (*Bos indicus*) comparando a PFA ainda são escassos. Raças *Bos indicus*
11 possuem diferenças bem estabelecidas em seu comportamento reprodutivo em comparação
12 com raças *Bos taurus* (Bó et al 2003; Baruselli et al. 2007; Sartori et al. 2010). Desse modo,
13 não se pode supor que as respostas em diversos parâmetros reprodutivos sejam os mesmos,
14 sendo necessários estudos para comparar a influência da PFA nestes animais.

15

16 2.3 DIFERENÇAS ENTRE ANIMAIS *BOS TAURUS* VS. *BOS INDICUS*

17

18 Existem diferenças já bem estabelecidas na fisiologia reprodutiva entre *Bos indicus* e
19 *Bos taurus*, que devem ser consideradas na introdução de um protocolo hormonal no rebanho,
20 na aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) para produção *in vitro* de embriões (PIVE),
21 bem como nas diversas biotécnicas reprodutivas. O conhecimento dessas particularidades é
22 fundamental para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos (Baruselli et al., 2007;
23 Sartori et al., 2010).

24 Fêmeas *Bos indicus* apresentam peculiaridades que dificultam o manejo e a eficácia da
25 detecção de estro, por exemplo, novilhas *Bos indicus* atingem a maturidade sexual e

1 puberdade mais tarde do que novilhas *Bos taurus* (Rodrigues et al., 2002), as zebuínas
2 apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas; Bó et al., 2003). Mais de
3 50% dessas fêmeas iniciam a manifestação de estro no período noturno e em média 30%
4 iniciam e encerram o estro durante a noite (Pinheiro et al., 1998).

5 Mizuta (2003) com auxílio de radiotelemetria (*Heat-Watch*) mostrou que a duração do
6 estro em Nelore é menor do que em Angus ($12,9 \pm 2,9$ horas em *Bos indicus* vs. $16,3 \pm 4,8$
7 horas em *Bos taurus*), mas o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferenças
8 entre estas duas raças (Nelore, $27,1 \pm 3,3$ horas vs. Angus, $26,1 \pm 6,3$ horas). Fêmeas *Bos*
9 *taurus* no geral possuem o período de gestação mais curto quando comparado com vacas *Bos*
10 *indicus* (Pascal et al., 1991).

11 Considerando o número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral, animais da
12 raça Holandesa apresentam predominância de duas a três ondas de crescimento folicular por
13 ciclo estral (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989; Wolfenson et al., 2004). Entretanto, em
14 zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a
15 presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – Rhodes et al.,
16 1995; Nelore – Figueiredo et al., 1997; Gir – Viana et al., 2000). Além da diferença no
17 número de ondas, as fêmeas *Bos indicus* têm uma população folicular maior por onda de
18 crescimento folicular em comparação com *Bos taurus* ($33,4$ folículos $\pm 3,2$ vs $25,4 \pm 2,5$;
19 Carvalho et al., 2008).

20 O diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento
21 folicular também difere entre fêmeas *Bos taurus* (17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda
22 onda; Ginther et al., 1989) e *Bos indicus* (11,3 e 12,1 mm, respectivamente; Figueiredo et al.,
23 1997). Para animais com três ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos foram de
24 16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1989) e 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos*
25 *indicus* (Figueiredo et al., 1997). O diâmetro do corpo lúteo também parece ser menor em *Bos*

1 *indicus* (17 a 21 mm de diâmetro; Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997) do que em *Bos*
2 *taurus* (20 a 30 mm de diâmetro; Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990). Da mesma
3 maneira, há relatos de que a concentração de progesterona produzida pelo corpo lúteo (CL)
4 também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (Segerson et al., 1984).

5 O número de oócitos recuperados por procedimento OPU também é distinto entre
6 estes grupos. Em raças *Bos indicus* a recuperação é 3 a 4 vezes maior, recuperando 18-25
7 oócitos (Thibier 2004; Pontes et al. 2011) e 4-14 oócitos em fêmeas *Bos taurus* (Rubin et al
8 2005;. Martins et al. 2007). Uma maior incidência de folículos com menor diâmetro é relatada
9 em fêmeas Nelore (Figueiredo et al., 1997).

10 Em relação a sincronização da ovulação de doadoras em protocolos de superovulação,
11 em fêmeas *Bos indicus* a indução de ovulação pode ser melhor obtida precocemente em
12 relação as *Bos taurus*. A aplicação do indutor de ovulação 12 horas após a última aplicação de
13 hormônio folículo estimulante (FSH) ocasionou aumento na resposta ovulatória e maior
14 número de embriões transferíveis em fêmeas zebuínas. Ao contrário do obtido em fêmeas
15 taurinas, a administração do indutor 24 horas após o último FSH resultou em melhores
16 resultados (Martins et al., 2005; Rodrigues et al., 2005; Baruselli et al., 2006). Existem
17 relatos que confirmam que é possível reduzir a dose de FSH para superovular fêmeas Nelore
18 (Baruselli et al., 2003).

19 Batista et al. (2014) demonstraram que a CFA nos ovários de fêmeas Nelore é maior
20 do que em Holandesa e esta diferença é semelhante ao encontrado por Segerson et al, (1984),
21 e Carvalho et al. (2008). Fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*) quando comparadas com
22 fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*) apresentam menor concentração plasmática de AMH e
23 menor CFA (Baldrighi et al., 2014)

24 Pontes et al. (2010) em um experimento com vacas Gir e Holandesa compararam o
25 recuperação de oócitos, qualidade dos oócitos recuperados por OPU e a produção *in vitro* de

1 embriões. O número de oócitos totais, oócitos viáveis e embriões produzidos *in vitro* foram
2 maiores em Gir do que na raça Holandesa (17,1 vs 11,4; 12,1 vs 8,0; 3,2 vs 2,2,
3 respectivamente), as taxas de prenhez foram de 40% em *Bos indicus* e 36% em *Bos taurus*.

4 O conhecimento das diferenças fisiológicas entre raças *Bos taurus* e *Bos indicus* tem
5 sido útil para desenvolver protocolos ou estratégias específicas para manejo reprodutivo,
6 maximando sua eficiência, e deve ser sempre levado em consideração na comparação de taxas
7 e resultados entre diferentes raças bovinas.

8

9 2.4 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

10

11 A PIVE é um conjunto de procedimentos realizados em laboratório, envolve as etapas
12 de colheita, maturação e fertilização *in vitro* de oócitos, bem como o cultivo *in vitro* de
13 zigotos e estruturas embrionárias. É uma biotécnica reprodutiva pelos quais oócitos imaturos
14 são utilizados para a produção de embriões (Viana et al., 2010).

15 A América do Sul é líder mundial na PIVE, uma biotecnologia de multiplicação rápida
16 e que tem crescido significativamente nos últimos anos (Viana et al., 2012; Marinho et al.,
17 2013). O destaque do Brasil no cenário mundial de PIVE, certamente possui relação direta
18 com o número de folículos e oócitos obtidos de fêmeas *Bos indicus* (Pontes et al., 2009; 2011;
19 Max et al., 2013).

20 As taxas de clivagem, blastocistos e eclosão, podem ser utilizadas para a avaliação da
21 eficiência da produção de embriões *in vitro*. Pontes et al. (2009) relataram taxa de blastocisto
22 de 41,4%, e 33,5% de prenhez, após a transferência dos embriões Nelore PIV. Resultados
23 semelhantes aos de Pontes et al. (2011) para a mesma categoria, de 37,3% de blastocisto e
24 36,5% de prenhez. Dados de Gimenes et al. (2010) apresentaram taxa de clivagem de 82,4% e
25 a taxa de blastocistos de 28,5% em novilhas Nelore.

1 A influência da CFA na produção *in vitro* de embriões, foi relatada em fêmeas *Bos*
2 *indicus-taurus*, a taxa de clivagem e blastocistos foram respectivamente, 56% e 9,4% em
3 fêmeas com baixa (≤ 10 folículos antrais), e 61,2% e 16,3% em fêmeas com alta (≥ 40) CFA
4 (Silva-Santos et al., 2014a).

5 Em uma pesquisa recente, Santos et al. (2014) compararam diversos parâmetros na
6 PIVE entre vacas Nelore com alta (≥ 40 oócitos), média (18-25 oócitos) e baixa (≤ 7 oócitos)
7 CFA. A percentagem de oócitos viáveis foi de 80% (G-Alta), 69% (G-Média) e 71% (G-
8 Baixa; $P < 0,05$), a taxa de clivagem foi de 79% (G-alta), 74% (G-Média) e 71% (G-Baixa;
9 $P < 0,05$), a taxa de blastocistos foi de 42% (G-Alta), 32% (G-Média) e 13% (G-Baixa;
10 $P < 0,05$), e a percentagem de embriões vitrificáveis de 81% (G-Alta), 77% (G-Média) e 58%
11 (G-Baixa; $P < 0,05$). Esses resultados demonstram uma correlação positiva da produção *in*
12 *vitro* de embriões com a PFA.

13 Considerando todas as informações citadas, constata-se a necessidade de uma proposta
14 para se estudar as categorias de folículos antrais em *indicus*, bem como a produção de
15 embriões neste contexto.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **REFERÊNCIAS**

2
3 ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em:
4 <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp#>. Acesso em: 14/01/2015. 2013.

5
6 ADAMS, G.P.; JAISWAL, R. Follicular dynamics in cattle: Historical overview and research
7 update. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.377-396, 2008.

8
9 ADAYEMO, O., HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos*
10 *indicus* heifers. **Theriogenology**, v.14, p.422-420, 1980.

11
12 AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the
13 bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in**
14 **Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2010.

15
16 BAERWALD A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON R.A. Characterization of ovarian follicular
17 wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1023–1031, 2003.

18
19 BALDRIGHI, J.M.; FILHO, M.F.S.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.;
20 BARUSELLI, P.S.; ASSUMPCÃO, M.E.O.A. Anti-Mullerian Hormone Concentration and
21 Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept
22 Under the Same Management. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.1015–1020,
23 2014.

24
25 BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.;
26 MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH
27 (Follitropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com
28 inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.244-245,
29 2003.

30
31 BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.T.; NOGUEIRA,
32 M.F.G.; BARROS, C.M.; BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle.
33 **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.

34
35 BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas
36 taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205-211, 2007.

37
38 BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; SA FILHO, M.F. History
39 evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal**
40 **Reproduction**, v.9, p.139–152, 2012.

41
42 BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.;
43 DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S.
44 Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos*
45 *indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**,
46 v.49, p.448-452, 2014.

47
48 BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular
49 development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.

50

- 1 BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J.
2 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation
3 among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum
4 follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.
5
- 6 CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.;
7 BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos*
8 *indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-
9 175, 2008.
- 10
- 11 CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C.
12 Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular
13 deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal**
14 **Reproduction Science**, v.98, p.189-96, 2006.
15
- 16 CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.;
17 FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef
18 cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal**
19 **Animal Science**, v.87, p.1971–1980, 2009.
20
- 21 EVANS, A.C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.;
22 IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of Maternal Environment During
23 Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring.
24 **Reproduction in Domestic Animal**, v.47 (Suppl. 4), p.31–37, 2012.
25
- 26 FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLE, J.M.P. Ovarian
27 follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47,
28 p.1489-1505, 1997.
29
- 30 FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIN, C.A. Manipulação de oócitos
31 inclusos em folículos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.;
32 FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo: Varela,
33 p.340, 2002.
34
- 35 GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS,
36 C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em
37 novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.210,
38 2005 (Resumo).
39
- 40 GIMENES, L.; AS, M.; CARVALHO, N.; TORRES, J.; SOUZA, A.; MADUREIRA, E.;
41 TRINCA, L.; SARTORELLI, E.; BARROS, C.; CARVALHO, J.; MAPLETOFT, R.;
42 BARUSELLI, P. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers.
43 **Theriogenology** v.69, p.852-8, 2008.
44
- 45 GIMENES, L. U.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; FANTINATO, NETO, P.; CHIARATTI,
46 M. R.; MESQUITA, L.G.; ARANGO, J. S. P.; RAPOSO, M.; SOUZA, D. C.; CALOMENI,
47 G. D.; GARDINAL, R.; RODRIGUEZ, C. L. V.; TRINCA, L. A.; MEIRELLES, F.V.;
48 BARUSELLI, O.S. OPU At different times of a synchronized follicular wave did not affect
49 IVP in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*. **Reproduction, Fertility and**
50 **Development**. v.22, p.293, 2010.

- 1
2 GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P.; Temporal associations among ovarian
3 events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of**
4 **Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.
5
6 GINTHER, O. J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection
7 of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187- 1194, 1996.
8
9 GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1st ed. **Cambridge: CAB**
10 **International: Raven Press**, 1994.
11
12 HULSHOF, S.C. J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN
13 HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries.
14 **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.
15
16 IETS. Statistics and Data Retrieval Committee Report. In: Embryo Transfer Newsletter.
17 **International Embryo Transfer Society**. v.31 (4), 2013.
18
19 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
20 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND,
21 J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
22 follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.
23
24 IRELAND, J. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZA, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGERA, J.
25 K.; IRELAND, J. L. H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Does size matter in
26 females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian
27 function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and
28 causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and**
29 **Development**, v.23, p.1–14, 2011.
30
31 IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.;
32 LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
33 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
34 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–
35 1695, 2007.
36
37 IRELAND, J. J.; ZIELAK, A.E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA,
38 A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH, G.W.; LONERGAN,
39 P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular
40 oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality
41 in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.
42
43 JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.;
44 DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high
45 variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus
46 luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. **Biology of**
47 **Reproduction**, v.80, p.1272–1281, 2009.
48

- 1 KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic
2 assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers.
3 **Theriogenology**, v.33, p.1269-1278, 1990.
4
- 5 LA MARCA, A.; VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is
6 measurement of circulating AMH a useful tool? **Clinical Endocrinology**, v.64(6), p.603–610,
7 2006.
8
- 9 MARINHO, L. S. R.; MACHADO, F.Z.; SENEDA, M. M.; 2013: Strategies to improve the
10 reproductive efficiency of dairy cattle. In: Nova Science Publishers (ed), **Dairy cows:
11 reproduction, nutritional management and diseases**. New York, pp 127–148.
12
- 13 MARTINEZ, M. F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L.; LAWRENCE, S.; BRYANT, A.;
14 SARA, E.; JUENGEL, J. Antral follicular count (AFC) and fertility in new zealand dairy
15 cows. **SSR 46th Anual Meeting**, p.23. 2013 (Abstracts).
16
- 17 MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES,
18 L.U., SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Produção embrionária de vacas Holandesas a
19 diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta
20 Scientiae Veterinariae**, v.33, p.227, 2005 (Resumo).
21
- 22 MARTINS, J. R. A.; TAKADA, L.; ABRAHÃO, R.G.; FREITAS, C.P.; CALEGARI, R.S.
23 Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento
24 promissor para maximizar a produção de embriões bovinos in vitro. **Acta Scientiae
25 Veterinariae**, v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).
26
- 27 MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores
28 plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas
29 bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelores x Angus (*Bos
30 taurus indicus x Bos taurus taurus*). 98f. **Tese (Doutorado em Reprodução Animal)** –
31 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP,
32 2003.
33
- 34 MOSSA F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
35 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
36 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
37 p.2355–2361, 2012.
38
- 39 PASCHAL, J.C.; SANDERS, J. O.; KERR, J. L. Calving and weaning characteristics of
40 Angus-, Gray Brahman-, Gir-, InduBrazil-, Nellore-, and Red Brahman-sired F1 calves.
41 **Journal Animal Science**, v.69, p.2395-2402, 1991.
42
- 43 PINHEIRO, V.G.; ERENO, R.L.; RAZZA, E. M.; BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. Is
44 the low number of ovarian antral follicles ≥ 3 mm in diameter associated with low fertility in
45 lactating nelore cows? **Reproduction, Fertility and Development**. v.27(1), p.99-100, 2014.
46 (Abstract)
47
- 48 PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEREDO, R. A.;VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO,
49 R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore

- 1 cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 α or
2 norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.
- 3
- 4 PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C.R.;
5 SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER,
6 F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo
7 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicus-taurus dairy cows
8 using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.
- 9
- 10 PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO,
11 S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of
12 embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore
13 (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.
- 14
- 15 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
16 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
17 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
18 donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
- 19
- 20 RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian
21 follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-277,
22 1995.
- 23
- 24 RUBIN, K.C.P.; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P.; MARQUES, M.O.;
25 SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para
26 obtenção in vivo de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004
27 (Resumo).
- 28
- 29 RODRIGUES H.D.; KINDER J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing
30 hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology**
31 **of Reproduction**. v.66, p.603-609. 2002.
- 32
- 33 RODRIGUES, C.A.; MANCILHA, R.F.; REIS, E.L.; AYRES, H.; GIMENES, L.U.; SÁ
34 FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Efeito do número de implantes de norgestomet e do
35 momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta**
36 **Scientiae Veterinariae**, v.33, p.229, 2005 (Resumo).
- 37
- 38 RODRIGUES, A.S.; OLIVEIRA, S.N.; LOIOLA, M.V.G.; ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ,
39 P.A.; AYRES, M.C.C.; BITTENCOURT, R.F.; CHALHOUB, M.; FILHO, A.L.R. Fertilidade
40 de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de
41 folículos antrais. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v.48, n.7, p.801-804, Brasília, 2013.
- 42
- 43 SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI F.;
44 SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of
45 antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-
46 time artificial insemination in nelore cattle. **Reproduction, Fertility and Development** v.27
47 p.206-206. 2014 (Abstract).
- 48

- 1 SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS
2 CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and
3 cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.
4
- 5 SARTORI, R.; BASTOS, M.; BARUSELLI, P.S; GIMENES, L.; ERENO, R.; BARROS, C.
6 Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and
7 *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v.67,
8 p.357-75, 2010.
9
- 10 SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157,
11 p.29-38, 1981.
12
- 13 SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant
14 follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83,
15 p.663-671, 1988.
16
- 17 SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian
18 and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal**
19 **Science**, v.59, p.1026-1046, 1984.
20
- 21 SENEDA, M.M.; GODMANN, M.; MURPHY, B.D.; KIMMINS, S.; BORDIGNON, V.
22 Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary.
23 **Reproduction**, v.135, p.829-838, 2008.
24
- 25 SENEDA, M.M.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.; SCHNEIDER, C.L. Fisiologia do
26 crescimento folicular em bovinos. In: 4° Simpósio internacional de reprodução animal
27 aplicada, v.4, Londrina. 2010, **Anais... Londrina: SIRAA**, p.14-22,2010.
28
- 29 SILVA C.F.; SARTORELLI, E.S. ; CASTILHO, A.C.S. ; SATRAPA, R.A.; PUELKER
30 R.Z.; RAZZA, E.M.; TICIANELLI, J.S.; EDUARDO, H. P.; LOUREIRO, B.; BARROS,
31 C.M. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos*
32 *taurus* embryos produced *in vitro*. **Theriogenology** v.79 p.351–357, 2013.
33
- 34 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
35 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
36 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In
37 Vivo – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
38 **Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014a.
39
- 40 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; SANTOS, J.T.; OLIVEIRA,
41 E.R.; MACHADO, F.Z.; ROSA, C.O; SENEDA, M.M. The correlation between the number
42 of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos*
43 *taurus* cows. **Animal Reproduction Science** v.151, p.119–125. 2014b.
44
- 45 SILVA-SANTOS K.C.; SILOTO, L. S.; SANTOS, G. M. G.; MOROTTI, F.;
46 MARCANTONIO T. N.; SENEDA, M. M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian
47 Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus*-*taurus* Cows with High or Low
48 Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animal**. v.49, p.48–51, 2014c.
49

1 SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G; EBERLIN, M.N; SILOTO,
2 L.S.; ROSA, C.O.; MARCANTONIO, T.N.; SENEDA, M.M. MALDI-MS Lipid Profiles of
3 Oocytes Recovered by Ovum Pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* x *taurus* with High vs
4 Low Oocyte Yields. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.711–718, 2014d.

5
6 STROUD, B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm
7 animals. **IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report**. 2012.

8
9 THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant
10 increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the
11 IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-
12 19, 2004.

13
14 VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine
15 immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction**
16 **Update**, v.6, p.457-474, 2000.

17
18 VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario.
19 **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 p.915–24, 2007.

20
21 VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics
22 in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.

23
24 VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and
25 perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**. v.9, p.12-18,
26 2012.

27
28 WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL. R.
29 Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and
30 nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

3. HIPÓTESE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

- A população de folículos antrais presente nos ovários de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) influencia a produção *in vitro* de embriões.

4. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a influência da população folicular antral sobre a produção *in vitro* de embriões de fêmeas Nelore com alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificação da média da população folicular antral a partir de uma amostragem de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) para classificação dos grupos experimentais;
- Comparar a produção *in vitro* de embriões (taxas de clivagem e blastocistos) entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais;
- Comparar a taxa de eclosão de embriões produzidos *in vitro* entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) de alta vs. média vs. baixa quantidade de folículos antrais;

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

IMPACTO DA POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* E TAXA DE ECLOSÃO DE EMBRIÕES *BOS INDICUS*

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

RESUMO

A influência da população folicular na fertilidade de fêmeas bovinas já foi relatada por diversos autores, porém resultados comparando a produção *in vitro* de embriões em fêmeas *Bos indicus* ainda são escassos. Com o objetivo de comparar a influência da população folicular antral na produção *in vitro* de embriões em fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*), ovários foram obtidos aos pares em abatedouro local. Para a quantificação da média da população folicular antral obteve-se ovários (n=336) de 168 fêmeas Nelore. A classificação dos grupos foi definida utilizando a média \pm desvio padrão, em G-Alta (≥ 92 folículos), G-Média (46-76 folículos) e G-Baixa (≤ 31 folículos). Para a produção *in vitro* de embriões foram utilizados 752 ovários de 356 animais em 9 réplicas. A quantidade de oócitos (n=15) por gota de meio e a quantidade de oócitos cultivados por grupo em cada réplica foram padronizadas. Foram comparadas as taxas de clivagem, blastocistos e eclosão entre os grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de regressão logística utilizando o pacote estatístico Car do software "R" (R Development Core Team – 2008), e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$. As taxas de clivagem e blastocisto não apresentaram diferenças entre os grupos (76,6% e 40,6% em G-Alta; n= 617 oócitos; 77,5% e 36,3% em G-Média; n= 590 oócitos; 79,5% e 38,6% em G-Baixa; n= 536 oócitos). A taxa de eclosão foi superior no G-Alta (16,5%) em comparação a G-Média (11,5%; $P = 0.0129$) e G-Baixa

1 (11,6%; P= 0.0179). Sugere-se que a produção *in vitro* de embriões de fêmeas Nelore, não
2 sofre influencia da população folicular antral. Entretanto, a contagem de folículos antrais pode
3 gerar influencia na eclosão de embriões, quando o método *in vitro* é utilizado.

4

5 **Palavras-chaves:** *Bos indicus*, Nelore, população folicular antral, produção *in vitro* de
6 embriões.

7

8

9 1. INTRODUÇÃO

10

11 A busca por indivíduos de potencial genético elevado e alta eficiência reprodutiva se
12 faz cada vez mais necessária na cadeia produtiva da carne e do leite. A produção *in vitro* de
13 embriões é uma biotécnica que vem crescendo significativamente nos últimos anos. O Brasil é
14 líder mundial na produção de embriões e isto se deve à grande população de bovinos no país,
15 e devido a maior parte do rebanho ser composta por animais da raça Nelore (*Bos indicus*;
16 STROUD, 2012; IETS, 2013; ABIEC, 2013).

17 Fêmeas *Bos indicus* possuem maior população de folículos antrais (PFA) em
18 comparação a fêmeas *Bos taurus* (Viana; Camargo, 2007; Batista et al., 2014), gerando uma
19 maior recuperação de oócitos (3 a 4 vezes maior) e produção de embriões (Thibier et al.,
20 2004; Pontes et al., 2011). As particularidades na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos*
21 *taurus* e *Bos indicus* podem gerar respostas distintas à produção *in vivo* e *in vitro* de embriões
22 (Baruselli et al., 2007).

23 Diversas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de evidenciar a influência da
24 contagem de folículos antrais (CFA) na fertilidade de fêmeas bovinas. Sabe-se que a PFA
25 possui grande variabilidade entre indivíduos e a CFA possui alta repetibilidade (0,85-0,95) no

1 mesmo indivíduo (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008; Mossa et al., 2010; Silva-
2 Santos et al., 2014).

3 Fêmeas Holandesas (*Bos taurus*) com baixa contagem de folículos antrais (≤ 15
4 folículos), possuem aspectos geralmente associados à baixa fertilidade (Burns et al., 2005;
5 Mossa et al., 2010; Ireland et al., 2011), como taxas menores de prenhez (84% vs 94%), maior
6 intervalo entre partos (114 vs 100 dias) e maior número de serviços por prenhez (2,7 vs 2,4)
7 em comparação com à fêmeas com alto número de folículos antrais (≥ 25 folículos; Mossa et
8 al., 2012).

9 Em um trabalho recente Silva-Santos et al. (2014), demonstraram que em fêmeas
10 Braford (*Bos indicus-taurus*) aos 24 meses, a CFA pode influenciar positivamente à produção
11 *in vitro* e *in vivo* de embriões, em fêmeas com alta (≥ 40 folículos) em comparação às de
12 baixa CFA (≤ 10 folículos).

13 Ainda são necessárias pesquisas para averiguar a influencia da PFA na fertilidade de
14 fêmeas *Bos indicus*. Com o objetivo de colaborar com essa investigação, o presente estudo
15 comparou a produção *in vitro* de embriões e a taxa de eclosão em fêmeas Nelore com alta,
16 média ou baixa contagem de folículos antrais.

17

18 2. MATERIAL E MÉTODOS

19

20 Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Companhia Sigma-
21 Aldrich (St Louis, MO, USA), a não ser quando especificado. Foram produzidos embriões *in*
22 *vitro* no decorrer de 9 réplicas a partir de oócitos provenientes de folículos de ovários de
23 abatedouro.

1

2 *2.1 Animais*

3

4 Ovários de vacas Nelores (*Bos indicus*; 72-96 meses), com escore de condição
5 corporal entre 3 e 3,5 (escala de 1 a 5) foram coletados de um abatedouro local. O par de
6 ovários de cada animal foi coletado, acondicionado separadamente por animal e transportado
7 em solução salina 0,9% a 30-35°C até o laboratório (trajeto de duração média de 20 minutos).

8

9 *2.2 Classificação dos animais pela contagem de folículos antrais*

10

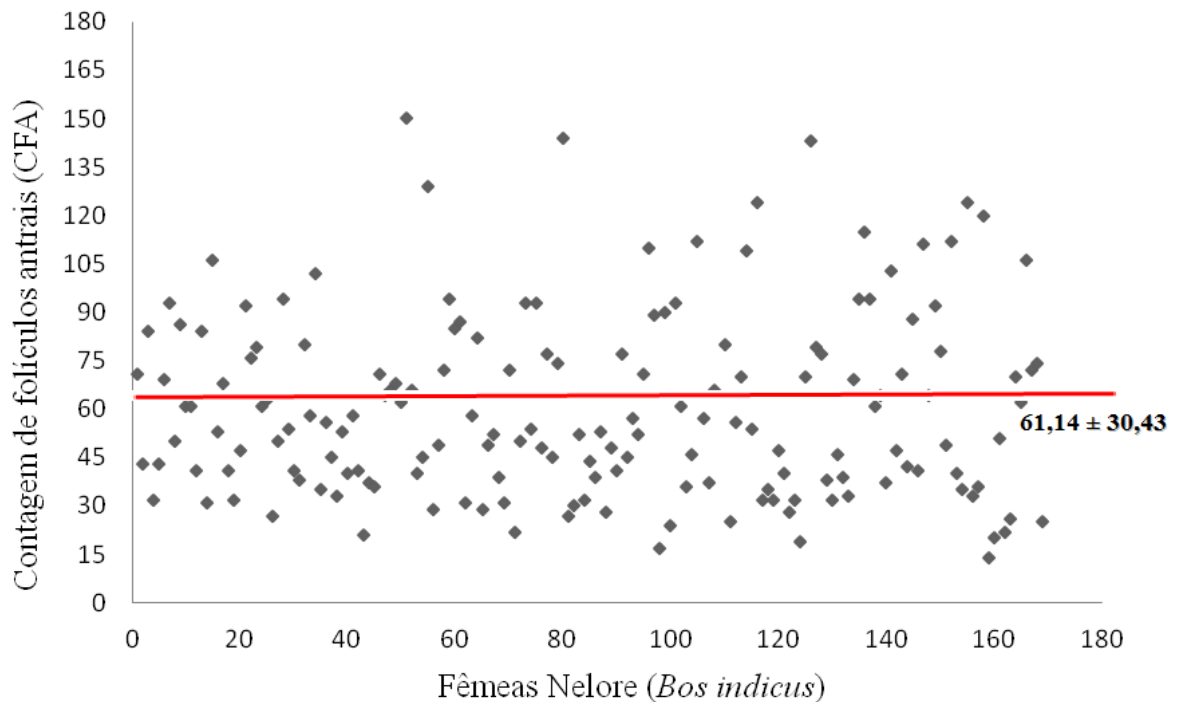
11 Previamente foi realizado um experimento piloto para quantificação da média da
12 população de folículos antrais, para possibilitar uma classificação dos grupos experimentais
13 mais fidedigna (n=168 fêmeas), realizado pela contagem dos folículos antrais (CFA) visíveis
14 na superfície dos ovários e considerando o par de ovários de cada animal (Fitzpatrick;
15 Entwistle, 1997; Cushmann et al., 2009). A CFA de todos os animais foi feita pelo mesmo
16 operador previamente treinado.

17 A distribuição das fêmeas de acordo com a média da CFA está demonstrada na Figura
18 -1. A média geral da quantificação da população de folículos antrais encontrada foi de $61,14 \pm$
19 $30,43$, e com base nos dados de média de CFA obtidos, os animais foram classificados em
20 três grupos.

21 O grupo de alta CFA foi obtido pela média da população folicular + 1 desvio padrão
22 (G-Alta: ≥ 92 folículos antrais). As fêmeas com CFA intermediária compreendem no intervalo
23 dos grupos G-Alta e G-Baixa (32-91 folículos antrais), entretanto, o grupo de média CFA foi
24 obtido pela média $\pm \frac{1}{2}$ do desvio padrão possibilitando um intervalo de maior confiabilidade
25 entre os grupos (G-Média: 46-76 folículos antrais). O grupo de baixa CFA, pela média - 1
26 desvio padrão (G-Baixa: ≤ 31 folículos antrais). A média da PFA encontrada dentro dos

1 grupos foi de 25, 60 e 113 folículos antrais para os grupos G-Baixa, G-Média e G-Alta,
 2 respectivamente.

3



4

5 **Figura 1-** Distribuição das fêmeas Nelore (*Bos indicus*; n=168) de acordo com a média da
 6 contagem visual de folículos antrais considerando o par de ovários.

7

8 Essa classificação foi utilizada como padrão para separação dos grupos experimentais
 9 para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Na recuperação de oócitos para produção *in*
 10 *vitro* de embriões bovinos, após a chegada dos ovários ao laboratório, foi realizada a CFA
 11 visual do par de ovários por animal (n=356 fêmeas), e a classificação destes nos grupos
 12 experimentais.

13

14 2.3 Recuperação oocitária

15

16 Cada folículo visível do par de ovários foi aspirado com agulhas hipodérmicas 30x8
 17 acopladas a seringas de 10 ml (BD Medical, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes,

1 NJ; Rizos et al., 2002), e os *complexo cumulus oophorus* (CCOs) foram recuperados
2 separadamente para cada grupo.

3

4 2.4 *Maturação in vitro (MIV)*

5

6 Os CCOs circundados por um mínimo de 3 camadas de células do *cumulus* e com
7 citoplasma homogêneo (graus 1 e 2; Seneda et al., 2001) foram selecionados para a maturação
8 *in vitro*. Antes da MIV, os oócitos foram lavados três vezes em TCM-HEPES 199 (Gibco
9 Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco Life
10 Technologies), 0,20 mM de piruvato de sódio, e 83,4 mg/mL de gentamicina (Instituto
11 Bioquímico, Rio de Janeiro, Brasil). Cada grupo foi cultivado separadamente em meio de
12 maturação em gotas de 100 mL sob óleo mineral, em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar, e
13 umidade saturada a 38,5°C, por 24 horas.

14 O número de oócitos foi padronizado em 15 por gota de 100 mL de meio, e em cada
15 réplica (n=9 réplicas) foram cultivados o mesmo número de oócitos por grupo experimental,
16 possibilitando uma melhor comparação entre os grupos.

17

18 2.5 *Fecundação in vitro (FIV)*

19

20 Após a maturação, os oócitos foram lavados em meio TCM-199 pré-fertilização
21 (suplementado com HEPES 25 mM e 0,3% de BSA), e uma vez em meio FERT-TALP
22 suplementado com 10 mg/mL de heparina e 160 mL de solução de penicilamina, epinefrina e
23 hipotaurina (PHE; Parrish et al., 1986; Bavister 1989). Os oócitos foram transferidos para as
24 gotas com sêmen e meio de fecundação FERT-TALP suplementado com heparina e PHE.

1 Para inseminação das gotas de 100 mL de meio durante todo o experimento foi
2 utilizado sêmen de um único touro Nelore, previamente testado. O sêmen armazenado em
3 nitrogênio líquido foi descongelado a 36°C por 30 segundos. A seleção dos espermatozoides
4 foi realizada pelo gradiente de Percoll (Percoll 45% na parte superior e 90% na parte inferior)
5 por centrifugação (12.100 g, por 2 minutos), o sobrenadante (600 µL) foi descartado e o
6 pellet espermático foi ressuspendido em 300 µL de meio de fecundação e homogeneizado.

7 O sêmen foi novamente centrifugado (8.127 g, por 45 segundos) e, após o descarte do
8 sobrenadante, a concentração espermática foi ajustada para a obtenção de uma concentração
9 final de 1×10^6 espermatozoides vivos/gota de 15 oócitos, co-incubados por 22 horas na
10 incubadora. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

11

12 2.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

13

14 Após a fecundação, os prováveis zigotos (G-Baixa n= 536; G-Média n= 590; G-Alta
15 n= 617) foram lavados e as células do *cumulus* foram removidas. Os prováveis zigotos foram
16 transferidos para o meio de cultivo *in vitro* (D1) constituído por fluido de oviduto sintético
17 modificado (SOFaa BSA contendo 8 mg/mL de BSA livre de ácido graxo e glutamina 1 mM),
18 sob a mesma temperatura e condições atmosféricas gasosas utilizadas nas etapas anteriores.

19 No terceiro dia de cultivo (D3) foi realizada a substituição (1° *feeding*) de 50% do
20 meio de cultivo com o mesmo meio utilizado inicialmente, e a taxa de clivagem foi avaliada
21 para cada grupo. No quinto dia de cultivo (D5), a substituição de 50% do meio (2° *feeding*)
22 foi realizada da mesma maneira, mas com o mesmo meio de CIV acrescido de glicose. A taxa
23 de blastocistos e de eclosão foram avaliadas no D7 e D8, respectivamente.

24

1 2.7 Análise estatística

2

3 Para as taxas de clivagem, blastocistos e eclosão, as respostas foram apresentadas
4 como percentagem e submetidas a um teste de regressão logística, utilizando o pacote
5 estatístico Car do software "R" (R Development Core Team - 2008). As diferenças foram
6 consideradas significativas se $p < 0,05$.

7

8 3. RESULTADOS

9

10 Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos para as taxas de clivagem
11 e blastocistos. Na comparação das taxas de eclosão houve diferença ($P < 0,05$) entre os grupos.
12 O grupo G-Alta (≥ 92 folículos antrais) apresentou maior taxa de eclosão em comparação ao
13 grupo G-Média (46-76 folículos; $P = 0,0129$) e G-Baixa (≤ 31 folículos; $P = 0,0179$; Tabela 1)

14

15 **Tabela 1** – Taxas de clivagem, blastocisto e eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*
16 a partir de oócitos provenientes de vacas Nelore com alta, média e baixa contagem de
17 folículos antrais.

18

Grupos CFA	Oócitos	Clivagem		Blastocistos		Eclosão	
	n	n	%	n	%	N	%
G-Alta (≥ 92)	617	473	76,6 ^a	251	40,6 ^a	102	16,5 ^a
G-Média (46-76)	590	457	77,5 ^a	214	36,3 ^a	68	11,5 ^b
G-Baixa (≤ 31)	526	418	79,5 ^a	203	38,6 ^a	61	11,6 ^b
Total	1.733	1.348	77,8	668	38,5	231	13,3

19

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

20

21 4. DISCUSSÃO

22

23 A taxa de eclosão obtida no grupo G-Alta foi superior aos demais grupos. Apesar de
24 não ter sido avaliada a viabilidade embrionária, nossos resultados podem sugerir uma maior

1 capacidade de gerar prenhez nos embriões oriundos de fêmeas Nelore de alta CFA (≥ 92
2 folículos antrais), considerando a estimativa da habilidade de implantação uterina a partir da
3 taxa de eclosão (Sanches et al., 2013). Este aspecto está em acordo com o relatado para vacas
4 da raça Holandesa (*Bos taurus*), em que fêmeas de alta CFA (≥ 25 folículos antrais)
5 apresentaram maior taxa de prenhez (94%) à inseminação artificial, em comparação com as
6 de baixa CFA (84%; ≤ 15 folículos; Mossa et al., 2012). Segundo Pontes et al. (2011),
7 doadoras da raça Nelore com elevada produção de oócitos (> 24), obtiveram maior taxa de
8 prenhez de embriões PIV, em comparação a fêmeas < 15 oócitos.

9 Diferente do encontrado em nosso estudo, Ireland et al. (2007) não relataram
10 influência da PFA sob a taxa de eclosão em embriões PIV de novilhas mestiças (*Bos indicus-*
11 *taurus*). As taxas de eclosão obtidas foram de 14 e 14,8% nos grupos de alta (≥ 25 folículos
12 antrais) e baixa (≤ 15 folículos) CFA, respectivamente.

13 As taxas de clivagem e blastocistos obtidas no presente estudo encontram-se dentro da
14 média esperada para um protocolo e sistema eficiente de produção *in vitro* de embriões. A
15 clivagem geral (77,8%) do experimento foi semelhante ao encontrado por Pontes et al. (2010),
16 que obtiveram 78% em vacas Holandesas e 68% em vacas Gir. A taxa de blastocistos geral
17 (38,5%) foi similar à encontrada por Pontes et al. (2009) de 41,4% em oócitos de fêmeas da
18 mesma raça e categoria do estudo apresentado.

19 As percentagens de clivagem e blastocistos dos grupos avaliados (Tabela 1) não
20 apresentaram diferença estatística entre os grupos, corroborando com os resultados relatados
21 em novilhas *indicus-taurus*, nos quais não houve diferença na produção *in vitro* de embriões
22 (PIVE), comparando fêmeas de alta (≥ 25 folículos antrais) e baixa (≤ 15 folículos) CFA
23 (Ireland et al., 2007).

24 Entretanto, os resultados do presente trabalho diferem dos de Santos et al. (2014) nos
25 quais estes autores demonstraram que fêmeas Nelore com alta CFA (≥ 40 oócitos recuperados

1 por OPU), apresentaram maior produção *in vitro* de embriões em comparação aos grupos de
2 média (18-25 oócitos) e baixa CFA (≤ 7 oócitos). As taxas de clivagem e blastocistos relatadas
3 foram, respectivamente, 79% e 42% no grupo de alta CFA, 74% e 32% no grupo de média e
4 71% e 13% no grupo de baixa.

5 Silva-Santos et al. (2014) em novilhas Braford (*indicus-taurus*), também obtiveram
6 uma maior PIVE em fêmeas com maior número de folículos antrais. As taxas de clivagem e
7 blastocisto foram, respectivamente, 61,25% e 16,53% em novilhas de alta CFA (≥ 40
8 folículos) e 56,03% e 9,48% de baixa CFA (≤ 10 folículos).

9 Vale ressaltar que os trabalhos publicados na literatura sobre a influência da PFA na
10 PIVE (Ireland et al., 2007; Silva-Santos et al., 2014; Santos et al., 2014) possuem algumas
11 diferenças na metodologia, em comparação ao nosso experimento. Os autores adotaram
12 diferentes classificações dos grupos de folículos, metodologia distinta para quantificação
13 folicular (ultrassom), e outras formas para recuperação dos oócitos (OPU), além do grupo
14 racial. Consideramos alguns aspectos favoráveis em nosso modelo experimental, como a
15 padronização das fêmeas para a condição do abate, rebanhos variados (condição mais próxima
16 da realidade) e o maior número de animais utilizados (n=356), quando comparamos com
17 todos os artigos citados (105, 10, 16 e 40 animais; Ireland et al., 2007; 2009; Mossa et al.,
18 2012; Silva-Santos et al., 2014).

19 A classificação dos animais em alta, média e baixa CFA não é padronizada, e diversas
20 classificações são relatadas na literatura para a mesma categoria de animais. Desse modo, não
21 podemos deixar de destacar a relevância do nosso estudo piloto para quantificação da média
22 da PFA, e o número de animais utilizados nesse experimento piloto (n=168), possibilitando
23 uma classificação mais confiável. Os dados obtidos (Figura-1) seguem a distribuição de 15% -
24 20% dos animais nos grupo de alta e de baixa contagem de folículos antrais, intervalos

1 também relatados por outros grupos dedicados ao tema (Ireland et al., 2011; Mossa et al.,
2 2012).

3 Fêmeas Nelore (*Bos indicus*) possuem maior incidência de folículos antrais pequenos
4 nos ovários (Figueiredo et al., 1997) e maior PFA (Batista et al., 2014), em comparação à *Bos*
5 *taurus*. Essas características podem sugerir uma dificuldade na contagem real dos folículos
6 antrais por ultrassonografia transretal em fêmeas Nelore, podendo ser subestimada devido a
7 sobreposição dos folículos na imagem do exame de ultrassom, e pela dificuldade de
8 delimitação da parede dos folículos.

9 Consequentemente, a contagem visual dos folículos antrais na superfície dos ovários
10 pode propor uma quantificação dos folículos antrais mais fidedigna, quando em comparação
11 com relatos obtidos por ultrassonografia. De acordo com o que inferem Fitzpatrick; Entwistle,
12 (1997), a contagem visual dos folículos em fêmeas *Bos taurus* possui uma alta correlação
13 positiva ($r=0,79$) com a população real de folículos antrais nos ovários. Além disso, em
14 ovários provenientes de abatedouro, os folículos <2 mm podem ser aspirados (Tan e Lu,
15 1990; Pavlok et al., 1992), uma situação que geralmente não ocorre na OPU em decorrência
16 da resolução média da imagem ultrassonográfica (Bungartz et al., 1995).

17 A classificação dos grupos pela CFA e recuperação dos oócitos no presente estudo,
18 forem realizadas pela mesma metodologia utilizada por Cushmann et al. (2009) e Ireland et al.
19 (2007) em vacas mestiças. Para uma melhor comparação entre os grupos, no presente estudo
20 foi feita a padronização de 15 oócitos por gota de meio, e a quantidade de oócitos iguais nos
21 três grupos em cada réplica.

22 Sabe-se, que as particularidades na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos taurus* e
23 *Bos indicus* podem gerar respostas distintas à produção *in vivo* e *in vitro* de embriões
24 (Baruselli et al., 2007). Pontes et al. (2010), em um experimento com vacas Gir (*Bos indicus*)
25 e Holandesa (*Bos taurus*), compararam o número de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões

1 produzidos *in vitro* e taxa de prenhez, que foram maiores em Gir em relação à Holandesa
2 (17,1 vs 11,4; 12,1 vs 8,0; 3,2 vs 2,2; 40% vs 36%, respectivamente). Trabalhos esses que
3 podem colaborar para explicar as diferenças dos nossos resultados com os obtidos por Silva-
4 Santos et al., (2014).

5 No contexto da investigação da influência da população folicular na fertilidade de
6 fêmeas *Bos indicus*, nossos resultados corroboram com os encontrados recentemente por
7 Pinheiro et al., (2015), que não encontraram influência da população folicular sobre a taxa de
8 prenhez à IATF em vacas Nelores. As taxas de prenhez obtidas foram: 32.6% no grupo de alta
9 CFA (≥ 38 folículos), 42.9% no grupo de média (28- 38 folículos) e 46.6% no grupo de baixa
10 (≤ 28 folículos; P = 0.144).

11 Em conclusão, a comparação da taxa de clivagem e de blastocistos de embriões Nelore
12 PIV, não diferiu entre os grupos de alta (≥ 92 folículos antrais), média (46-76) e baixa (≤ 31)
13 CFA. Entretanto, os embriões de fêmeas Nelore de alta população folicular (≥ 92 folículos
14 antrais), demonstraram taxa de eclosão superior aos demais grupos. A produção *in vitro* de
15 embriões Nelore (*Bos indicus*) não sofreu influência da população folicular, porém, a eclosão
16 dos embriões foi influenciada pela população de folículos antrais.

17

18

19

20

21

22

23

24

1 REFERÊNCIAS

2
3 ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em:
4 <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp#>. Acesso em: 14/01/2015. 2013.

5
6 BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas
7 taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205-211, 2007.

8
9 BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.;
10 DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S.
11 Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos*
12 *indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**,
13 v.49, p.448-452, 2014.

14
15 BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden
16 hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, p.139–158, 1989.

17
18 BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMAN, H. Collection of oocytes from
19 cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment
20 and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v.43, p.667–675, 1995.

21
22 BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J.
23 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation
24 among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum
25 follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.

26
27 CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.;
28 FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef
29 cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal**
30 **Animal Science**, v.87, p.1971–1980, 2009.

31
32 FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular
33 dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

34
35 FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W. A comparison of dissected follicle numbers and
36 follicle counts on the ovarian surface for the evaluation of ovarian follicular populations in
37 *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.46(3-4), p.179-86, 1997.

38
39 IETS. Statistics and Data Retrieval Committee Report. In: Embryo Transfer Newsletter.
40 **International Embryo Transfer Society**. v.31 (4), 2013.

41
42 IRELAND, J. J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.;
43 IRELAND, J.L.H; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in
44 females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian
45 function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and
46 causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and**
47 **Development**, v.23, p.1–14, 2011.

48
49 IRELAND, J. J.; ZIELAK, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA,
50 A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P.G.; SMITH, G.W.; LONERGAN,

- 1 P.; EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular
2 oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality
3 in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.
- 4
- 5 IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.;
6 LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
7 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
8 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–
9 1695, 2007.
- 10
- 11 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
12 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND,
13 J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically
14 healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79,
15 p.1219–1225, 2008.
- 16
- 17 MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.;
18 LONERGAN, P.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in antral
19 follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in
20 cattle. **Reproduction**, v.140, p.713–720, 2010.
- 21
- 22 MOSSA F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
23 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
24 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
25 p.2355–2361, 2012.
- 26
- 27 PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIEDGE-RUTHEDGE, M.L.; CRITSER, E.
28 S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen.
29 **Theriogenology**, v.25, p.591–600, 1986.
- 30
- 31 PAVLOK, A.; LUCANS, H.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of
32 bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction
33 and Development**, v.31, p.63–67, 1992.
- 34
- 35 PINHEIRO, V.G.; ERENO, R.L.; RAZZA, E. M.; BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. Is
36 the low number of ovarian antral follicles ≥ 3 mm in diameter associated with low fertility in
37 lactating nelore cows? **Reproduction, Fertility and Development**, v.27(1), p.99-100, 2015.
38 (Abstract)
- 39
- 40 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
41 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
42 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
43 donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
- 44
- 45 PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO,
46 S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of
47 embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore
48 (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.
- 49
- 50 PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C.R.;

- 1 SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER,
2 F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo
3 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows
4 using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.
5
- 6 RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; ET AL. Consequences of bovine oocyte maturation,
7 fertilization or early embryo development *in vitro versus in vivo*: implications for blastocyst
8 yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61. p.234–248,
9 2002.
10
- 11 SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.R.; FILHO, B.D.O; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.;
12 MEIRINHOS, M.L.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA, M.M.
13 Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to
14 forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v.80, p.372–377, 2013.
15
- 16 SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI F.;
17 SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of
18 antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-
19 time artificial insemination in nelore cattle. **Reproduction, Fertility and Development** v.27
20 p.206-206. 2014 (Abstract).
21
- 22 SENEDA M.M.; ESPER C.R.; GARCIA J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship
23 between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal**
24 **Reproduction Science**, 67:37–43, 2001.
25
- 26 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
27 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
28 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In
29 Vivo – of *Bos indicus-taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
30 **Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014.
31
- 32 STROUD, B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm
33 animals. **IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report**. 2012.
34
- 35 TAN, S.J.; LU, K.H. Effects of different oestrus stages of ovaries and sizes of follicles on
36 generation of bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, v.33, p.335, 1990.
37
- 38 THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but
39 significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report
40 from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society**
41 **Newsletter**, p.12-19, 2004.
42
- 43 VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario.
44 **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 p.915–24, 2007.
45
46
47
48

6. CONCLUSÕES

- A média da contagem dos folículos antrais em fêmeas Nelore (*Bos indicus*) foi de 61,14 folículos. Os grupos experimentais foram classificados em G-Alta (≥ 92 folículos antrais), G-Média (46-76) e G-Baixa (≤ 31 folículos);
- As taxas de clivagem e blastocistos não diferiram entre os grupos de contagem de folículos antrais. A população de folículos antrais não apresentou influencia na produção *in vitro* de embriões Nelore (*Bos indicus*);
- A taxa de eclosão foi superior no grupo de animais com alta contagem de folículos antrais (≥ 92 folículos) em comparação aos demais grupos. A população de folículos antrais pode influenciar a taxa de eclosão de embriões Nelore (*Bos indicus*);

7. ANEXOS

1

2

3

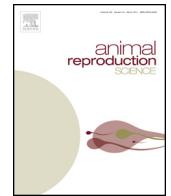
Os dois artigos anexados a seguir foram realizados durante o período do mestrado.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows



Katia Cristina Silva-Santos^a, Gustavo Martins Gomes dos Santos^a,
Letícia Schmidt Siloto^a, Joabel Tonello dos Santos^b,
Eduardo Rael de Oliveira^c, Fernanda Zandonadi Machado^a,
Camila Oliveira Rosa^a, Marcelo Marcondes Seneda^{a,*}

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

^b Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97105-900 Brazil

^c Departamento de Zootecnia, CCA- Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, 86051-990, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2014

Received in revised form

12 September 2014

Accepted 15 October 2014

Available online 24 October 2014

Keywords:

Preantral follicles

Antral follicular count

Ovaries

Bos indicus

Bos taurus

Cattle

ABSTRACT

The objectives of this study were to compare populations of preantral follicles between purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows with high or low antral follicle counts (AFC) and to correlate the number of preantral follicles with the population of antral follicles. Nelore (*Bos indicus*, $n = 100$) and Angus (*Bos taurus*, $n = 100$) cow ovaries were collected at abattoirs and examined using ultrasonography. Antral follicles ≥ 3 mm were counted, and the cows ovaries were assigned to high (G-High) or low (G-Low) AFC groups based on the mean number (± 1 SD) of ovarian antral follicles: *Bos indicus* with high AFC (≥ 57 follicles, $n = 8$) or low AFC (≤ 21 follicles, $n = 8$) and *Bos taurus* with high (≥ 45 follicles, $n = 10$) or low AFC (≤ 13 follicles, $n = 10$). The ovaries were processed, and the number of preantral follicles was estimated. Between-groups comparisons were performed using a Kruskal-Wallis test, and the correlation between preantral and antral follicles was evaluated using a Pearson's correlation test ($P \leq 0.05$). A large variation in the number of preantral follicles was observed among the animals. Although there was a correlation between the population of preantral follicles and the number of antral follicles, there was no difference between the mean number of preantral follicles in the *Bos indicus* G-High ($48,349 \pm 30,149$) and G-Low groups ($33,037 \pm 31,710$) or between the *Bos taurus* G-High ($35,050 \pm 36,060$) and G-Low groups ($30,481 \pm 43,360$). Therefore, the preantral follicle population did not differ between purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle with high or low AFC but was correlated with the number of antral follicles. In addition to the large within-groups variation in the number of preantral follicles, some cows with high AFC had lower populations of preantral follicles compared to the low AFC group, and the highest population of preantral follicles was observed in both *Bos indicus* and *Bos taurus* with low AFC.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 43 99485394; fax: +55 43 33714063.
E-mail addresses: marcelo.seneda@gmail.com, mseneda@uel.br (M.M. Seneda).

1. Introduction

More oocytes can be obtained by *ovum pick up* (OPU) in *Bos indicus* compared to *Bos taurus* cattle (Pontes et al., 2009, 2010), and researchers wish to identify the underlying mechanism that determines this larger oocyte production. *Bos indicus* cows typically have many follicular waves (Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000), follicles per wave (Carvalho et al., 2008) and antral follicles <5 mm in diameter (Segerson et al., 1984) but small corpora lutea (CL; Rhodes et al., 1995; Sartorelli et al., 2005) compared to *Bos taurus* females. However, no studies have explained the differences in oocyte production between these breeds.

Variation in the number of antral follicles in female bovine ovaries has been associated with anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations (Ireland et al., 2008, 2009; Rico et al., 2009, 2011; Ereno et al., 2012). AMH has been used to predict ovarian response to a stimulatory treatment in women (Van Rooij et al., 2002; Gruijters et al., 2003; Broer et al., 2009) and antral follicle count (AFC) has also been used to predict poor ovarian response prior to *in vitro* fertilization (IVF) in women with the identical level of accuracy and clinical value as AMH (Hendriks et al., 2005, 2007; Broer et al., 2009). In cattle, both AMH and AFC can be used to determine embryo production capacity (Monniaux et al., 2010; Rico et al., 2009, 2011, 2012). The number of antral follicles observed during a follicular wave is a repeatable observation (Singh et al., 2004; Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008, 2009, 2011; Silva-Santos et al., 2014a,b), which allows females to be ranked according to reproductive capacity using transvaginal ultrasound. An earlier study has also shown that cows with a low AFC exhibit lower fertility (Mosca et al., 2012).

Preantral follicle numbers are also highly variable among females (Erickson, 1966; Silva-Santos et al., 2011, 2014a,b). A correlation has been observed between the antral follicle population and the number of healthy follicles and oocytes in *Bos taurus* females with high and low AFC (Ireland et al., 2008). However, a comparison between different purebred cattle with high vs. low AFC was not conducted in this study. We hypothesize that there is a correlation between populations of preantral and antral follicles in cattle with high or low AFC. Therefore, the aim of the present study was to compare ovarian populations of preantral follicles in purebred *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Aberdeen Angus) females with high or low AFC and to correlate the preantral follicle population with the number of antral follicles.

2. Materials and methods

2.1. Ovary collection and antral follicular count

Ovaries ($n=200$) from 72- to 96-month-old cycling and non-pregnant purebred cows (Nelore, *Bos indicus*, $n=100$, and Aberdeen Angus, *Bos taurus*, $n=100$) were collected at abattoirs. Prior to slaughter, the females were maintained on cultivated pasture and fed mineral salt *ad libitum*. At slaughter, the mean body condition was 4 ± 0.5 (scale, 1–5; Lowman et al., 1976). All cattle were carefully evaluated according to body condition and health parameters

before slaughter. The ovaries were transported to the laboratory in saline at 32–35 °C within three hours of collection. Immediately upon arrival, the ovaries were evaluated using ultrasonography, and follicles ≥ 3 mm were counted (Silva-Santos et al., 2014a,b). Each ovary was scanned with a 7.5-mHz convex-array transducer (Águila PRO, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands) from end-to-end to count antral follicles ≥ 3 mm. The AFC per pair of ovaries was determined for each animal. Following the ultrasound evaluation, the females were assigned to two groups according to the number of antral follicles ≥ 3 mm: females with a high (G-High) or low AFC (G-Low). The number of follicles per group (G-High vs. G-Low) was defined using the mean number of antral follicles per animal ± 1 standard deviation (SD): Nelore cows with G-High (≥ 57 follicles; $n=8$) or G-Low (≤ 21 follicles; $n=8$) and Aberdeen Angus cows with G-High (≥ 45 follicles; $n=10$) or G-Low (≤ 13 follicles; $n=10$). Animals with an intermediate AFC (Nelore, 22–56 follicles; Angus, 14–44 follicles) were eliminated from further analysis.

Following the antral follicle count, the ovaries were halved longitudinally and fixed in Bouin's fixative for 24 h. The ovaries were then placed in 70% alcohol. For an estimate of the preantral follicles, only ovaries without CL were used to provide histological sections with ovarian parenchyma and follicular population. Only one ovary per female was analyzed (Silva-Santos et al., 2011).

2.2. Histological evaluation and preantral follicle classification

The ovarian halves were dehydrated in alcohol, cleared with xylene and embedded in paraffin, and all tissue was serially sectioned at 7 μ m with a rotating microtome (Leica®, Wetzlar, Germany). In all ovaries, each 120° histological section (Cahill et al., 1979) was mounted and stained with periodic acid Schiff (PAS) and hematoxylin. All sections were used to evaluate the number of healthy follicles. Preantral follicles were classified according to developmental stage, primordial (one layer of flattened or flattened-cuboidal granulosa cells surrounding the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte), or secondary (oocyte surrounded by more than one complete layer of cuboidal granulosa cells; Hulshof et al., 1994; Carámbula et al., 1999) and as normal or degenerated according to their morphological appearance. The follicles were considered degenerated if they had one or more of the following aspects: a condensed oocyte nucleus, a shrunken oocyte, pyknotic bodies in the granulosa cells, low cellular density, or basement membrane breakdown. Based on these parameters, only morphologically healthy follicles were evaluated (Lucci et al., 2002). The sections were examined and photographed using a light microscope (Nikon®, Tokyo, Japan). Using an ocular micrometer, we determined the mean diameters of the oocytes by measuring two follicles in each category (primordial, primary, and secondary) per section in which the nucleolus of the oocyte was observed (equatorial section). Each follicle and its associated oocyte were measured in two dimensions, and the arithmetic mean of the two measures was determined. The strategy used to identify oocyte nuclei was important to

Table 1

Mean (\pm SD) number of preantral follicles per ovary and antral follicles per female of *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Aberdeen Angus) cows (72–96 mo) with high (G-High) vs. low (G-Low) AFC.

Groups	No. preantral follicles per ovary				No. antral follicles per female
	Primordial	Primary	Secondary	Total	
<i>Bos indicus</i> G-High AFC (≥ 57 follicles, $n=8$)	31,639 ^a ($\pm 22,398$)	12,714 ($\pm 14,341$)	3,996 ($\pm 3,288$)	48,349 ($\pm 30,149$)	663 \pm 8 ^a
<i>Bos indicus</i> G-Low AFC (≤ 21 follicles, $n=8$)	18,766 ^{ab} ($\pm 18,493$)	9,116 ($\pm 9,359$)	5,155 ($\pm 6,794$)	33,037 ($\pm 31,710$)	115 \pm 5 ^b
<i>Bos taurus</i> G-High AFC (≥ 45 follicles, $n=9$)	19,777 ^{ab} ($\pm 25,412$)	11,337 ($\pm 11,568$)	4,174 ($\pm 2,893$)	35,288 ($\pm 38,239$)	552 \pm 7 ^a
<i>Bos taurus</i> G-Low AFC (≤ 13 follicles, $n=10$)	11,273 ^b ($\pm 20,713$)	15,617 ($\pm 21,383$)	3,591 ($\pm 3,200$)	30,481 ($\pm 43,360$)	111 \pm 3 ^b

^{a-c} Within a column, means without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

prevent the identical follicle from being counted in two sections. All procedures were performed by one operator.

2.3. Preantral follicle estimation

The number of preantral follicles was estimated by counting all follicles in all histological sections that corresponded to the entire ovary. Counting was performed by one operator in a blind trial. To avoid counting one follicle twice within a section, the border of the histological section was marked with a pen. The evaluation began from this point and followed a clockwise direction until the cortical portion was evaluated entirely. A follicle was counted only if the oocyte nucleus was visible in that histological section. The nucleus of the oocyte was used as a marker, according to the correction factor described by Gougeon and Chainy (1987) and the following formula: $Nt = (No \times St \times ts) / (So \times do)$, where Nt = the estimated total number of follicles in each category; No = the number of follicles observed in the ovary; St = the total number of cuts performed on the ovary; ts = the cutting thickness; So = the total number of sections evaluated; and do = the mean diameter of the follicle nucleus for each category.

2.4. Statistical analysis

The results are presented as the means \pm SD. Minitab 16 was used to test sample normality. The numbers of antral follicles were compared using a Kruskal-Wallis test with the Dunn test for between-group comparisons. The correlation between antral and preantral follicles was analyzed using a Pearson's Linear Correlation test and a log-10 transformation. For all analyses, at least a 5% level of probability was required.

3. Results

Based on the ultrasound evaluation of 200 ovaries from *Bos indicus* ($n=100$) and *Bos taurus* females ($n=100$), the mean number of antral follicles was 63 ± 8 (G-High AFC) and 15 ± 5 (G-Low AFC) in *Bos indicus* cows and 59 ± 23 (G-High AFC) and 11 ± 3 (G-Low AFC) in *Bos taurus* females (Table 1).

The mean number of preantral follicles per ovary was similar ($P > 0.05$) for *Bos indicus* and *Bos taurus* females. There were $48,349 \pm 30,149$ (mean \pm SD) preantral follicles

in *Bos indicus* ovaries with high AFC and $33,037 \pm 31,710$ in those with low AFC. In *Bos taurus* females, there were $35,050 \pm 36,060$ and $30,481 \pm 43,360$ preantral follicles in ovaries with high and low AFC, respectively (Table 1).

The number of preantral follicles varied among individuals within a group (high or low) and breed (Fig. 1). Variation within Nelore females ranged from 13,660 to 87,638 (G-High) and 2462 to 93,560 follicles (G-Low). For Angus females, the number of preantral follicles ranged from 5388 to 120,493 (G-High) and 1348 to 147,006 (G-Low; Fig. 1). We observed contrasting situations for preantral and antral follicle populations, as shown in Fig. 1. Some animals with low AFC presented higher numbers of preantral follicles and vice versa. Additionally, in 37.5% of G-High AFC Nelore cows, the mean number of preantral follicles was smaller than that of the mean G-Low population, and 25% of G-Low AFC Nelore cows had the largest mean number of preantral follicles compared to the mean population of the G-High Nelore group. For Angus cows, 60% of the G-High AFC group had the smallest population of preantral follicles compared to the mean number of G-Low in Angus, and 20% of the G-Low AFC preantral follicle population in Angus cows was greater than the mean number in the G-High Angus group (Fig. 1).

Despite the within-group individual variation for the number of follicles, AFC was positively correlated with the number of primordial follicles ($r=0.43$; $P < 0.05$) and the total number of preantral follicles in the ovaries ($r=0.38$; $P < 0.05$; Table 2).

Among the ovaries assessed ($n=26$), 14 (54%) had multi-oocyte follicles (primordial, primary and secondary). Multi-oocyte follicles were observed in 25% of *Bos indicus* with high AFC, 50% of *Bos indicus* with low AFC, 40% of *Bos taurus* with high AFC and 40% of *Bos taurus* with low AFC. The number of oocyte nuclei varied (2–5) within the multi-oocyte follicles. Ovigerous cords were observed in two *Bos taurus* cows: one from the high AFC group and one from the low AFC group (Fig. 2).

The histological classifications of polyovular follicles and ovigerous cords. Ovigerous cords (A) and multi-oocyte follicles (B) in the ovary of a *Bos taurus* cow with low AFC and multi-oocyte follicles in the ovary of a *Bos indicus* cow with low AFC (C). The presumptive nucleus of oogonia (arrows) within the ovigerous-like cords and presumptive nucleus of oocytes (Nu) were enclosed within a follicle-like cell with a single layer of granulosa cells (GC). The

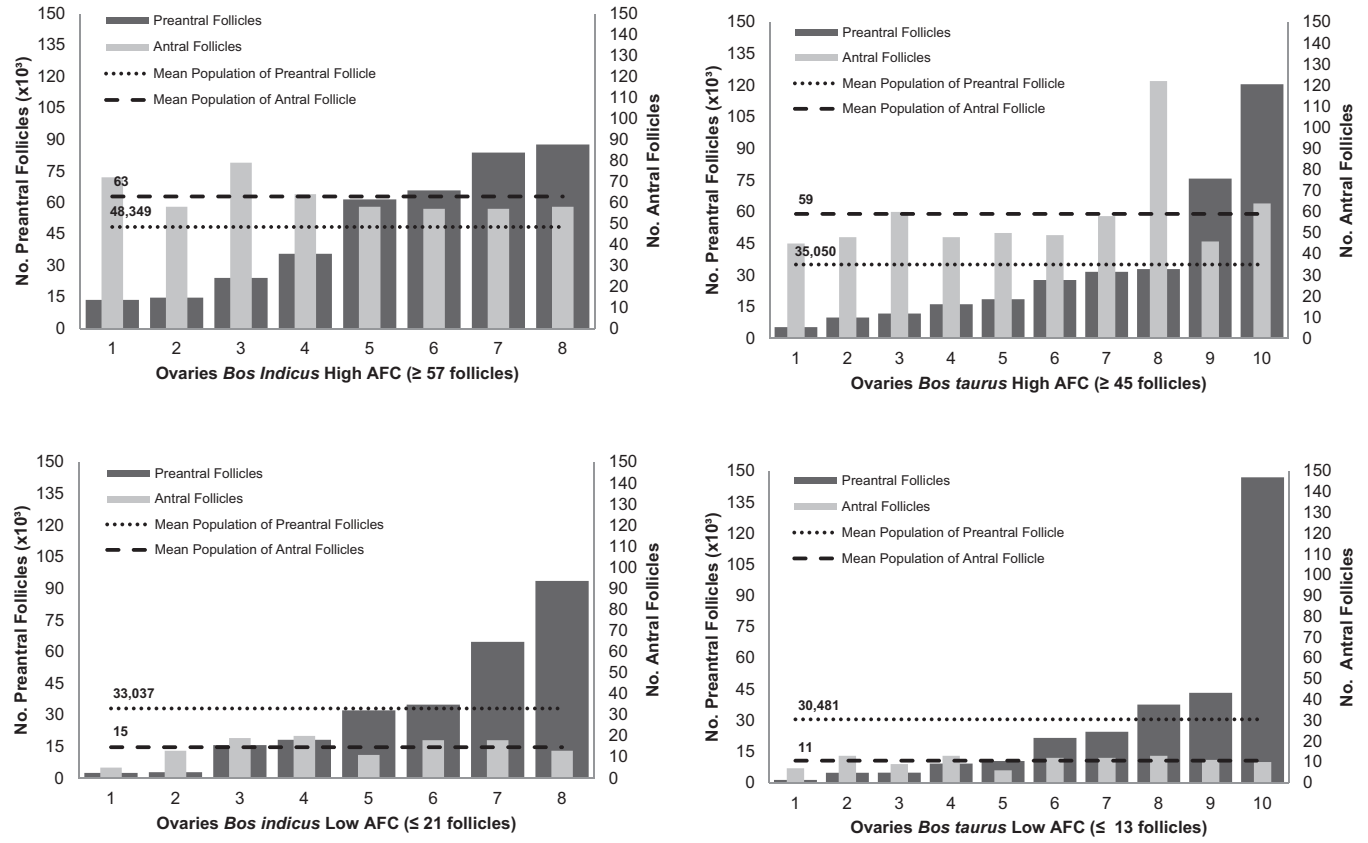


Fig. 1. Variation in the preantral follicle population among individuals of the same group (G-High vs. G-Low AFC) and between breeds (Nelore–*Bos indicus* vs. Aberdeen Angus–*Bos taurus*).

Table 2
Pearson correlation coefficients for populations of preantral and antral follicles.

	AFC	No. primordial follicles	No. primary follicles	No. secondary follicles	No. total preantral follicles
AFC	1	0.43 [*]	0.18	0.24	0.38 [*]
No. Primordial follicles		1	0.67 ^{***}	0.40 [*]	0.90 ^{***}
No. Primary follicles			1	0.75 ^{***}	0.88 ^{***}
No. Secondary follicles				1	0.70 ^{***}
No. Total preantral follicles					1

^{*} $P < 0.05$.

^{**} $P < 0.01$.

^{***} $P < 0.001$.

sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) and hematoxylin. Bars = 50 μ m. Original magnification X400.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first comparative study examining populations of preantral ovarian follicles subsequent to antral follicle counts in ovaries retrieved from many cycling and non-pregnant purebred cows (Nelore–*Bos indicus* and Aberdeen Angus–*Bos taurus*) at slaughter. Although there are remarkable variations in the number of antral follicles during follicular waves among cattle, repeatability in antral follicle populations allows the identification of cattle with high or low antral follicle counts based on AFC (Singh et al., 2004; Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008, 2011; Silva-Santos et al., 2014a,b). The antral follicle population is constant within individuals regardless of age, season, lactation stage or management conditions (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008; Silva-Santos et al., 2014a,b). AFC has an identical accuracy level and clinical value as AMH in predicting responses to assisted reproduction therapy (ART) in women (Hendriks et al., 2005; Broer et al., 2009) and can be used to predict the number of antral follicles in *Bos indicus* and *Bos taurus* females (Batista et al., 2014). These results suggest that AFC can be used in cattle because it is an inexpensive, easy-to-use tool that can improve field results.

In the present study, the mean number of preantral follicles was similar for *Bos indicus* and *Bos taurus* females with high and low AFC, although the ovaries were obtained from many cows (100 per breed) and the high or low AFC groups that only included females with antral follicle populations corresponding to extremes of 8% in *Bos indicus* and 10% in *Bos taurus*. Similar to previous studies by our group (Silva-Santos et al., 2011, 2014a,b), the preantral follicle populations showed considerable between- (Nelore and Aberdeen Angus of different ages – fetuses, heifers and cows; and Nelore and 1/2 Nelore \times Angus cows with high or low AFC) and within-group variation among females. Conversely, differences have been observed in the number of preantral follicles in *Bos taurus* females between high and low AFC groups (Ireland et al., 2008). Breed might have generated this difference. In the present study, we evaluated the ovaries of purebred cattle that were genetically selected over several generations, whereas an earlier study compared preantral follicle populations between crossbred beef cattle. *Bos taurus* females within the high AFC group presented herein had ≥ 45 antral follicles and corresponded to 10% of Angus cows, whereas Ireland et al. (2008) reported ≥ 25 antral follicles, which corresponded to approximately 20% of the total individuals.

Previous studies have reported the total number of preantral follicles in cattle ovaries (Erickson, 1966; Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2011), but none have

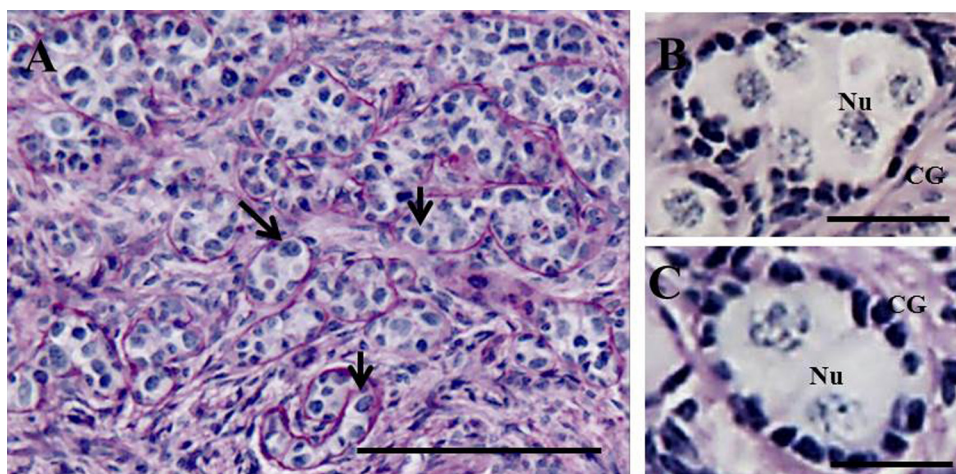


Fig. 2.

compared the ovarian reserve (preantral follicle population) of two purebred beef cows with remarkably high or low AFC selected from many animals. The mean number of preantral follicles in *Bos taurus* females with high AFC (35,050 follicles) in the present study was slightly higher than previously reported for *Bos taurus* cows with high AFC (29,056 follicles; Ireland et al., 2008).

In this study, we confirmed that preantral follicle populations were similar between *Bos indicus* and *Bos taurus*, regardless of the number of antral follicles in the ovaries, breed or age (Silva-Santos et al., 2011). However, there was a correlation between the AFC and number of primordial and total preantral follicles (Table 2). G-High AFC cows had an average of 15,312 (*Bos indicus*), or ~32%, and 4,807 (*Bos taurus*), or ~14%, more follicles than G-Low AFC cows. Most likely, the large variation in the number of preantral follicles accounted for this situation, which makes statistical comparison difficult, as has been previously observed in most bovine ovaries (Silva-Santos et al., 2011). The correlation observed between AFC and the primordial and total preantral follicles was to be expected because primordial follicles account for the majority of the preantral follicle population. However, although the cows were methodically assigned to groups of high or low AFC, the proportion of primordial follicles to total preantral follicles in *Bos indicus* (65% in the High- and 57% in the Low-AFC group) was similar to the result observed previously in *Bos indicus* cows, regardless of AFC (62%; Silva-Santos et al., 2011). In this context, it is noteworthy that *Bos indicus* females have more follicular waves (Viana et al., 2000), more follicles per wave (Carvalho et al., 2008) and more oocytes recovered by OPU (Pontes et al., 2009, 2010) than *Bos taurus* females. Furthermore, fewer antral follicles are associated with lower reproductive performance and suggest suboptimal fertility (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008, 2009, 2011; Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2012). However, whether a high number of antral follicles per follicular wave is positively associated with fertility is still to be determined.

It has been previously suggested the oocyte generation in postnatal mammalian adult ovaries (Johnson et al., 2004, 2005; Zou et al., 2009) and the epigenetic regulation of histone 3 at lysine 4 (H3K4) in folliculogenesis (Seneda et al., 2008), as occurs in mammalian spermatogenesis (Godmann et al., 2007). Additionally, the lineages of *Bos indicus* and *Bos taurus* females may have influenced our results. Large variations were observed within both groups (high and low) although the individuals used in this study were purebred, and only 8–10% of cows at each extreme (high or low AFC) were selected. Some cows with high AFC (37.5% in Nelore and 60% in Angus) had the lowest preantral follicle populations compared to the mean of the low AFC group, and some females with low AFC (25% in Nelore and 20% in Angus) had more preantral follicles compared to the mean of the high AFC group (Fig. 1). The first scenario (females with high antral follicle counts and few preantral follicles) is noteworthy. Why the numbers of antral follicles are repeatable in cows with low numbers of preantral follicles is not clear. The opposite observation (females with low antral follicle counts and many preantral follicles) can be understood. In this scenario, females do not

recruit these follicles to grow and develop until the antral stage. In addition to these observations, the highest population of preantral follicles was observed in both *Bos indicus* and *Bos taurus* cows in the low AFC group.

In the present study, we observed ovigerous cords and multi-oocyte follicles in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows with high and low AFC (Fig. 2). The highest frequency of multi-oocyte follicles was observed in *Bos indicus* ovaries with low AFC (50%). Conversely, in an earlier study, higher frequencies of multi-oocyte follicles were observed in *Bos taurus* fetuses, heifers and cows compared to *Bos indicus* cattle of identical age (Silva-Santos et al., 2011). These structures are typically described in fetuses undergoing primordial follicle formation (Diniz et al., 2005; Yang and Fortune, 2008; Silva-Santos et al., 2011). Currently, the roles of ovigerous cords and multi-oocyte follicles in the ovaries of adult cows are not well understood, although they have both been reported in young and adult cattle (Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2011).

In conclusion, although there was a correlation between preantral and antral follicle populations, there was no difference in the number of preantral follicles between *Bos indicus* and *Bos taurus* cows with high and low numbers of antral follicles during follicular waves, which may be because of the large variation in the number of preantral follicles among individuals in the identical group. Furthermore, some cows with high AFC presented few preantral follicles compared to the low AFC group, while the highest population of preantral follicles was observed in cows with low AFC.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Post-Graduation Program in Animal Science at the State University of Londrina and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Batista, E.O.S., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M.D.D.V., Sa Filho, M.F., Del Valle, T.A., Jesus, E.F., Lopes, R.N.V.R., Renn, F.P., Baruselli, P.S., 2014. Plasma Antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 448–452.
- Broer, S.L., Mol, B.W.J., Hendriks, D., Broekmans, F.J.M., 2009. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil. Steril.* 91, 705–714.
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. 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.* 73, 53–62.
- Cahill, L.P., Mariana, J.C., Mauléon, P., 1979. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55, 27–36.
- Carámbula, S.F., Gonalves, P.B.D., Costa, L.F.S., Figueiredo, J.R., Wheeler, M.B., Neves, J.P., Mondadori, R.G., 1999. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology* 52, 563–571.
- Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI

- protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69, 167–175.
- Diniz, E.G., Esper, C.R., Jacomini, J.O., Vieira, R.C., 2005. Morphological development of the ovaries in embryos and fetuses of Nelore breed. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 70–76.
- Ereno, R.L., Pupulum, A.G., Loureiro, B., Favoreto, M.G., Castilho, A.C.S., Buratini, J., Barros, C.M., 2013. (abstract). The effect of nutrition on ovarian follicle population and plasma anti-Müllerian hormone concentration in Aberdeen Angus heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 236, <http://dx.doi.org/10.1071/RDv25n1Ab175>.
- Erickson, B.H., 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25, 800–805.
- Figueiredo, R.A., Barros, C.M., Pinheiro, O.L., Sole, J.M.P., 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47, 1489–1505.
- Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Di Sauro, A., Sette, C., Behr, R., Kimmins, S., 2007. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 77, 754–764.
- Gougeon, A., Chaïny, G.B.N., 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fertil.* 81, 433–442.
- Grujters, M.J., Visser, J.A., Durlinger, A.L., Themmen, A.P., 2003. Anti-müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol. Cell Endocrinol.* 211, 85–90.
- Hendriks, D.J., Mol, B.W., Bancsi, L.F., Te Velde, E.R., Broekmans, F.J., 2005. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after *in vitro* fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil. Steril.* 83, 291–301.
- Hendriks, D.J., Kwee, J., Mol, B.W., Te Velde, E.R., Broekmans, F.J., 2007. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil. Steril.* 87, 764–775.
- Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van Den Hurk, R., 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet. Quart.* 16, 78–80.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. 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.* 22, 1687–1695.
- Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.L., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225.
- Ireland, J.J., Zielak, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettogowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 954–964.
- 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., 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 1–14.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., Tilly, J.L., 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145–150.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.J., Adams, G.B., Nikura, Y., Tschudy, K.S., Tilly, J.C., Cortes, M.L., Eorkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D.T., Tilly, J.L., 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral. *Cell* 122, 303–315.
- Lowman, B.G., Scott, N.A., Somerville, S.H., 1976. Condition scoring of cattle. Revised edition. East Scotland College of Agriculture, pp. 1–31 (Bulletin 6).
- Lucci, C.M., Rumpf, R., Figueiredo, J.R., Bão, S.N., 2002. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology* 57, 1467–1483.
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., Larroque, H., 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1083–1091.
- 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., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 2355–2361.
- 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., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71, 690–697.
- Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G., Sanches, B.V., Porcionato, J.P.F., Vieira, P.H.S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L., Seneda, M.M., 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74, 1349–1355.
- Rhodes, F.M., De'ath, G., Entwistle, K.W., 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 265–277.
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.F., Monniaux, D., 2009. Antimüllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59.
- Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., Monniaux, D., 2011. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol. Reprod.* 84, 560–571.
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J.L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S., Monniaux, D., 2012. 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.* 24, 932–944.
- Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfeldt, D.R., Ginther, O.J., Barros, C.M., 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63, 2382–2394.
- Segerson, E.C., Hansen, T.R., Libby, D.W., Randel, R.D., Getz, W.R., 1984. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 59, 1026–1046.
- Seneda, M.M., Godmann, M., Murphy, B.D., Kimmins, S., Bordignon, V., 2008. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction* 135, 829–838.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Hertel, M.F., Andrade, E.R., Rubin, M.L.B., Sturion, L., Sterza, F.A.M., Seneda, M.M., 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. *Theriogenology* 76, 1051–1057.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M., 2014a. Comparison of antral and preantral ovarian follicle populations between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* cows with high or low antral follicles counts. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 48–51.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Koetz Júnior, C., Morotti, F., Siloto, L.S., Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C.M., Seneda, M.M., 2014b. Antral follicle populations and embryo production-*in vitro* and *in vivo*-of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 228–232.
- Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227–243.
- Van Rooij, I.A., Broekmans, F.L., Te Velde, E.R., Fauser, B.C., Bancsi, L.F., Jong, F.H., Themmen, A.P.N., 2002. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17, 3065–3071.
- Viana, J.H.M., Ferreira, A.M., Sá, W.F., Camargo, L.S.A., 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35, 2501–2509.
- Yang, M.Y., Fortune, J.E., 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod.* 78, 1153–1161.
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J., 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell Biol.* 11, 631–636.

MALDI-MS Lipid Profiles of Oocytes Recovered by Ovum Pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* with High vs Low Oocyte Yields

KC Silva-Santos¹, CR Ferreira², GMG Santos¹, MN Eberlin², LS Siloto¹, CO Rosa¹, TN Marcantonio¹ and MM Seneda¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Brazil;

²ThoSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas, Londrina, Brazil

Contents

The aim of the present study was to compare the lipid profile in oocytes of *indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* cows with high and low antral follicle count (AFC)/oocyte yields. After an OPU procedure (D0), antral follicles ≥3 mm were counted by ultrasonography (D4, 19, 34, 49, 64), and cows were assigned to groups with either high AFC (≥30 follicles; *indicus*, NH group; 1/2 *indicus* × *taurus*, AH group) or low AFC (≤15 antral follicles; *indicus*, NL group; 1/2 *indicus* × *taurus*, AL group). The lipid profiles of the oocytes were determined by MALDI-MS. For GI, GII and GIII oocytes, the *indicus* samples tend to cluster separately from the 1/2 *indicus* × *taurus* samples. The lipid species [PC (P-38:5) + H]⁺ and/or [PC (P-36:2) + Na]⁺, [PC (38:2) + H]⁺, [PC (38:5) + Na]⁺ and [TAG (60:8) + NH⁺]⁺ were more abundant in *indicus* (NH and NL groups) than 1/2 *indicus* × *taurus*. The higher lipid content in the *indicus* oocytes likely reflects differences in the rate of lipid metabolism and may contribute to oocyte competence and embryo development.

Introduction

Bos indicus cows usually produce more oocytes than *Bos taurus* donors (Machado et al. 2006; Pontes et al. 2009; Pontes et al. 2010). Good oocyte yield can be obtained from *B. indicus* and *B. taurus* crosses (Pontes et al. 2010). The adaptability of *indicus-taurus* cross-bred females to tropical climates has encouraged their use in tropical and subtropical areas. There is, however, great variation in oocyte production among individuals (Pontes et al. 2009, 2011). Although it is possible to produce more embryos and pregnancies following OPU/*in vitro* embryo production (IVP) than superovulation/embryo transfer (ET) in *indicus* cows (Pontes et al. 2009), individual variation is observed in the oocyte production of cows with *indicus* and *indicus-taurus* backgrounds. There is, however, little information about the oocyte differences between these cattle types.

Triacylglycerides (TAG) predominate the lipid content of the cytoplasm of mammalian cells, forming lipid droplets (Ferguson and Leese 1999; Hulbert 2003; Aardema et al. 2011; McKeegan and Sturmey 2011). These lipids are crucial for oocytes and embryos because they function as a form of energy storage (Sturmey et al. 2009). In eukaryotic cell membranes, phospholipids (PL) are the most abundant lipids, and phosphatidylcholines (PCs) and sphingomyelins (SMs) influence fluidity, permeability, and thermal phase behaviour (Edidin 2003).

In mammalian gametes, immature oocytes have much lower mitochondrial activity than *in vitro*-matured oocytes (Van Blerkom et al. 2002; Tarazona et al. 2006), and developmental competence does not seem

to be influenced by the number of active mitochondria in immature bovine oocytes (Castaneda et al. 2013). In oocytes with low-developmental competence, early activation of mitochondria may be triggered by lipids (Castaneda et al. 2013).

The developmental capacity of oocytes to undergo maturation, fertilization and early cleavage is influenced by both lipid content and mitochondrial activity (McEvoy et al. 2000; Cummins 2004). During maturation, lipase activity remains constant (Cetica et al. 2002), whereas triacylglyceride and cholesterol stores are reduced (Kim et al. 2001; Ferguson and Leese 1999) and mitochondrial activity increases (Tarazona et al. 2006). These trends suggest that lipids are used as a cellular energy source. In addition, lipid–organelle interactions likely occur during oocyte maturation because the mitochondria, lipids and smooth endoplasmic reticulum remain in clusters (Fleming and Saacke 1972; Hyttel et al. 1997).

Among the analytical techniques for lipid analysis of mammalian oocytes and pre-implantation embryos, mass spectrometry (MS) is emerging as a powerful tool. MS has been used to obtain lipid structural information from individual or small pools of oocytes (2–5) from human, bovine, sheep, mouse, canine and feline species as well as from individual pre-implantation embryos obtained from cattle and mice (Ferreira et al. 2010, 2012a,b; Apparicio et al. 2012; Sudano et al. 2012). The most commonly used MS technique for lipid profiling in oocytes and embryos is matrix-assisted desorption/ionization (MALDI; Ferreira et al. 2010). A more direct approach using an ambient desorption/ionization technique (DESI) has also been demonstrated recently (Ferreira et al. 2012b). MALDI-MS has been used under conditions that favour the detection of PC, SM and TAG.

In the present study, MALDI-MS lipid profiles of oocytes from *B. indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* donors with high and low oocyte yields were compared to identify significant lipid structural differences. We predict that lipids have potential as biomarkers for early diagnosis of high-oocyte-yield animals and that lipid analysis may contribute to the elucidation of the molecular mechanisms underlying higher oocyte yields.

Materials and Methods

Animals

Nelore females (*B. indicus*, n = 20) and 1/2 Nelore × Angus females (*indicus/taurus*, n = 20) that were 6–8 years old and had a body weight of 450 ± 10 kg and a

body condition score of 3.5 ± 0.5 (scale, 1–5; Lowman et al. 1976) were subjected to follicular aspiration on random days during the oestrous cycle (D0) to promote the ablation of all follicles ≥ 3 mm and the beginning of a new follicular wave. Animals were maintained in a *Brachiaria brizantha* pasture supplemented with mineral salt *ad libitum*. Some of the animals were selected for lipid profile evaluation based on the antral follicle count (described below).

Antral follicular counting

Ovaries from each animal were monitored with a 7.5-convex intravaginal array transducer (Áquila PRO; Pie medical, Maastricht, The Netherlands) at 15-d intervals after OPU (Days 4, 19, 34, 49, and 64), and antral follicles were counted as described previously (Burns et al. 2005; Ireland et al. 2008). Each ovary was scanned from end to end to identify positions of the CL and antral follicles ≥ 3 mm, which were drawn on an ovarian map. Each follicle was measured, and the diameter was averaged and recorded next to the appropriate follicle on each ovarian map. The antral follicle count (AFC – total number of antral follicles ≥ 3 mm in diameter) per pair of ovaries was determined for each animal. After five ultrasound evaluations performed by the same operator, females were assigned to two groups based on the number of antral follicles ≥ 3 mm in diameter: females with a consistently high (≥ 30 follicles; *indicus*, $n = 3$; $1/2$ *indicus* \times *taurus*, $n = 5$) or low AFC (≤ 15 follicles; *indicus*, $n = 4$; $1/2$ *indicus* \times *taurus*, $n = 4$) in all ultrasound scans. Animals with intermediate AFC (>15 and <45 follicles) were not studied further.

Follicular aspiration and oocyte recovery

Oocytes were obtained by follicular aspiration from *indicus* and $1/2$ *indicus* \times *taurus* females with high and low AFC. Briefly, each visible follicle was aspirated using a real-time B-mode ultrasound scanner (Áquila PRO; Pie medical), a 7.5-MHz convex array transducer fitted into the intravaginal device (Pie Medical) and a stainless steel guide. Follicular puncture was performed using a disposable 19-gauge $1/2$ " hypodermic needle (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brazil) connected to a 50-ml conical tube (Corning, Acton, MA, USA) via silicon tubing (0.8 m; 2 mm id). Aspiration was performed using a vacuum pump (WTA, Watanabe, Cravinhos, São Paulo, Brazil) with a negative pressure of 75 mm Hg. The collection medium was phosphate buffer solution (PBS-Nutricell, Campinas, SP, Brazil) with 10 000 IU/l sodium heparin (Sigma H-3149; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immediately after recovery, the aspirated material was washed and filtered through an Emcon embryo filter (Immuno Systems Inc., Spring Valley, WI, USA) with a phosphate buffer solution (PBS-Nutricell). The cumulus oocyte complexes (COCs) were classified according to the presence of cumulus cells and the oocyte quality using the following criteria: (i) COCs from pre-antral follicles, (ii) grade I (GI), (iii) grade II (GII), (iv) grade III (GIII), (v) denuded, (vi) expanded and (vii) atretic oocytes.

Experimental design

Of the 83 oocytes recovered by OPU, only oocytes classified as GI, GII and GIII (total $n = 53$; 23 mass spectra) were considered in the lipid profile and statistical analysis for the breed and oocyte yield comparison. The four experimental groups were defined as follows: oocytes from *indicus* cows with high AFC (NH group; $n = 31$; 10 mass spectra), *indicus* cows with low AFC (NL group; $n = 5$, 3 mass spectra), $1/2$ *indicus* \times *taurus* cows with high AFC (AH group; $n = 12$, 6 mass spectra) and $1/2$ *indicus* \times *taurus* with low AFC (AL group, $n = 5$, 4 mass spectra).

Lipid analysis by MALDI-MS

Sample preparation

Each *indicus* or $1/2$ *indicus* \times *taurus* cumulus oocyte complex with cumulus cells and homogeneous cytoplasm was denuded of cells by gentle pipetting in 0.5% hyaluronidase. All oocytes were washed three times in drops of a PBS solution containing 0.1% polyvinyl alcohol and stored in microtubes containing 100 μ l of a 50% aqueous methanol solution (ACS/HPLC grade; Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)/ultrapure water (Millipore, Bedford, MA, USA) at -80°C for transportation and immediate analysis. Sample preparation involved placing each oocyte in a given spot of the target plate under the stereomicroscope. Samples were allowed to dry at room temperature, and their location was recorded to place the laser at the correct location during analysis. Just before analysis, 1 μ l of 1.0 M 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) in methanol was placed in each target spot and allowed to dry at room temperature.

MALDI-MS data acquisition

Oocytes were washed in ultrapure H_2O /methanol 1:1 (v/v) and placed (one to four oocytes of the same quality/spot) in the MALDI target plate. After drying at room temperature, samples were then covered with 1 μ l of 2,5-DHB 0.5 M dissolved in pure methanol as the MALDI matrix. The MALDI target plate was then immediately placed in a Q-ToF Premier (Synapt HDMS) mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with a 200 Hz solid-state laser in the m/z 700–1200 range, operated in the reflection and QTOF modes. The instrument operating conditions were a laser energy of 250 a.u. and a sample plate voltage of 20 V. Unmodified (i.e. no extraction procedure) oocytes were directly analysed. All mass spectra were manually collected for approximately 1 min in positive ion mode. Mass spectra were processed with MassLynx 4.1 software (Waters Corp. Milford, MA, USA).

Statistical analysis

A list of the relative ion abundances of the samples organized in columns was constructed using Excel software. The data were uploaded as a .csv file in the online software MetaboAnalyst (Xia et al. 2009; Xia et al. 2011a; Xia et al. 2012) as a peak intensity table in unpaired columns. Because relative ion abundances

(and not absolute ion counts) were used, no further normalization was performed. The data were submitted to a partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). This analysis is a supervised clustering method in which previous knowledge of the classes is used during the classification process. PLS-DA projects the data into a low-dimensional space that maximizes the separation between the different groups of data in few dimensions (called latent variables), which are ranked by how well they explain the variance of the data. PLS-DA in MetaboAnalyst produces the variable importance measures by weighting a sum of squares of the PLS loadings that takes into account the amount of explained variance of each component (Xia and Wishart 2011b,c). The average values of lipid ion abundance and the standard deviation were calculated using Excel software.

Results

Bovine oocytes recovered by OPU were classified according to their quality in (i) COCs from pre-antral follicles, (ii) GI, (iii) GII, (iv) GIII and (v) expanded oocytes. When only information on oocyte quality – regardless of breed and oocyte yield/antral follicle count – was plotted in PLS-DA analysis, the pre-antral and expanded samples were separated from the other groups (Fig. 1). COCs from the pre-antral follicles presented the lowest abundance of SM [SM (16:0) + Na]⁺ at m/z 725.4; PC [PC (38:2) + H]⁺ at m/z 814.8; plasmalogen [PC (P-38:5) + H]⁺ and/or [PC (P-36:2) + Na]⁺ at m/z 792.8; and [PC (38:7) + H]⁺ and/or [PC (36:4) + Na]⁺ at m/z 804.4; and higher abundances of [PC (32:1) + Na]⁺ at m/z 754.4

Table 1. Lipid species presenting the highest PLS-DA scores in the MALDI-MS lipid profiles of bovine oocytes used in this work

m/z	Attribution [class (number of carbons/unsaturated carbons) + proton/adduct] ⁺
725.4	[SM (16:0) + Na] ⁺ ^a
754.4	[PC (32:1) + Na] ⁺ ^a
792.4	[PC (P-38:5) + H] ⁺ , [PC (P-36:2) + Na] ⁺ ^b
804.4	[PC (38:7) + H] ⁺ and/or [PC (36:4) + Na] ⁺ ^a
814.4	[PC (38:2) + H] ⁺ ^a
830.8	[PC (38:5) + Na] ⁺ ^b
990.8	[TAG (60:8) + NH ₄] ⁺ ^b

SM, sphingomyelin; PC, phosphatidylcholine, TAG, triacylglycerol. An error of up to 0.3 Da was considered acceptable due to the TOF resolution. The 'P-' prefix is used for the 1Z-alkenyl ether (Plasmalogen) substituent. ^aAttribution has been performed based on our previous work using the same methodology of lipid analysis in mammalian oocytes (Ferreira et al. 2010; Sudano et al. 2012). ^bAttribution has been performed based on LipidMaps (The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>) considering that MALDI in positive ion mode with DHB as an organic matrix is highly selective for SM, PC and TAG detection.

(Table 1), whereas the expanded oocytes presented higher abundances of m/z 725.4, 814.8, 792.8 and 804.4 and lower abundances of m/z 754.4. The lipid profiles of oocytes from GI, GII and GIII were similar and could not be distinguished based on their lipid profiles. Figure 2 shows representative MALDI mass spectra. To eliminate interference due to oocyte quality in further PLS-DA analysis of the four experimental groups, only GI, GII and GIII oocytes were considered.

When considering only GI, GII and GIII oocytes, *indicus* samples tended to cluster separately in the PLS-DA plot from 1/2 *indicus* × *taurus* samples, particularly the NH group (Fig. 3), whereas 1/2 *indicus* × *taurus*

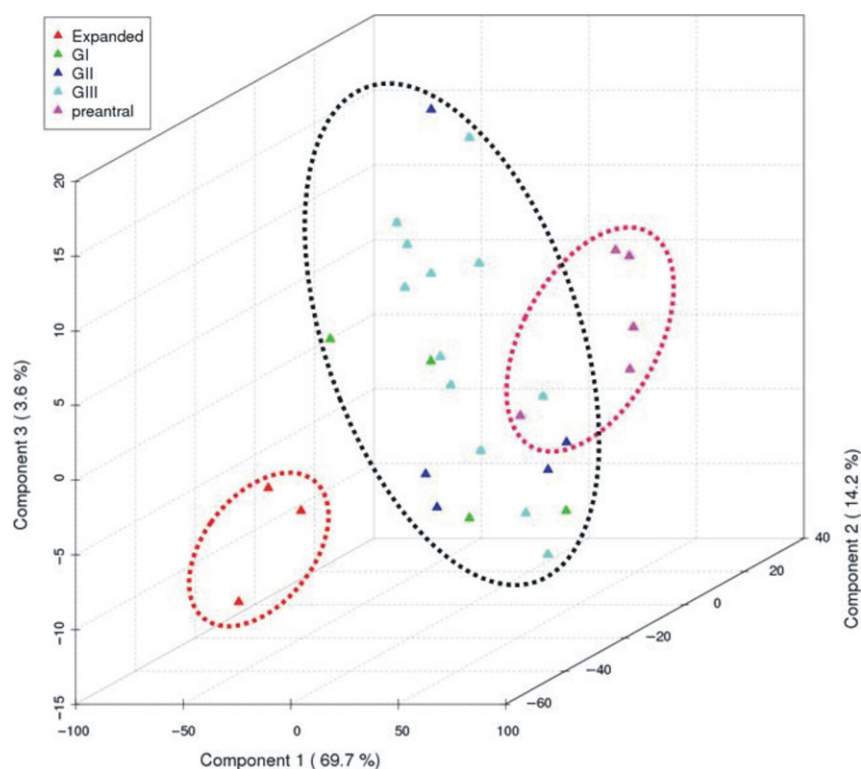


Fig. 1. Tridimensional PLS-DA score plot of the oocytes collected by OPU for use in this study ($n = 83$, 31 mass spectra). The analysis considered the lipid profile according to oocyte quality independent of breed or oocyte yield. Expanded oocytes ($n = 8$, 3 spectra) are represented by red triangles; GI oocytes ($n = 10$, 4 spectra) by green triangles; GII oocytes ($n = 12$, 5 spectra) by dark blue triangles; GIII oocytes ($n = 31$, 14 spectra) by light blue triangles; and COCs from pre-antral follicles ($n = 23$, 5 spectra) by pink triangles. Each component indicates the percentage of the variability of the data that is explained

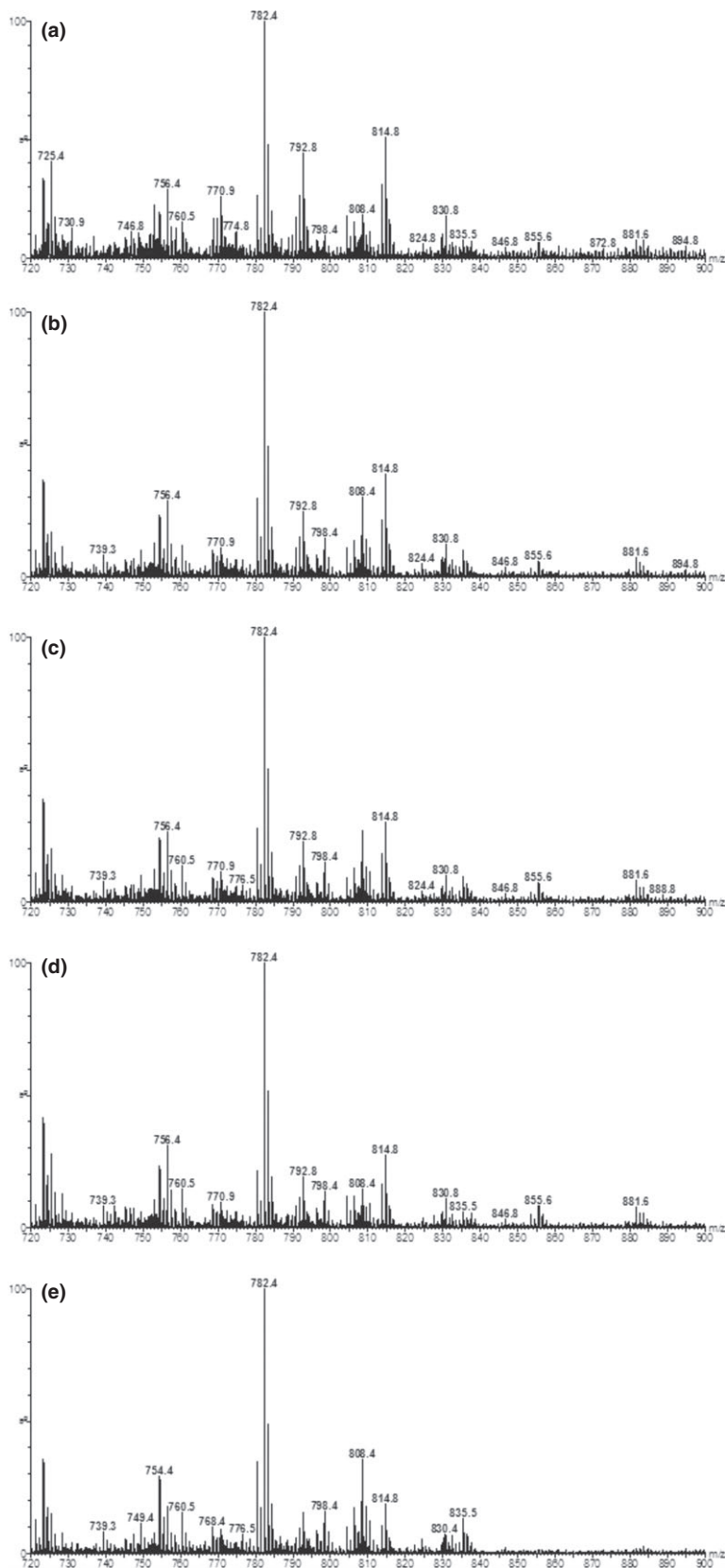


Fig. 2. Representative MALDI-MS of (a) expanded oocytes; (b) GI; (c) GII; (d) GIII oocytes; (e) COCs from pre-antral follicles

oocytes (AH and AL group) were mixed. The most important ions that explain this variability are those at m/z 792.8, 814.8, $[\text{PC} (38:5) + \text{Na}]^+$, at m/z 830.8, and $[\text{TAG} (60:8) + \text{NH}_4]^+$ at m/z 990.8, which were more

abundant in the NH and NL groups than in the AH and AL groups.

The relevance of the four most abundant ions present in *indicus* oocytes was further confirmed by plotting the

Fig. 3. Tridimensional PLS-DA score plot of representative oocytes from each of the four experimental groups. *1/2 indicus* × *taurus* cows with high AFC (AH group, n = 12, 6 mass spectra) are represented by red triangles; *1/2 indicus* × *taurus* cows with low AFC (AL group, n = 5, 4 mass spectra) by green triangles; *indicus* cows with high AFC (NH group; n = 31; 10 mass spectra) by dark blue triangles; and *indicus* cows with low AFC (NL group; n = 5, 3 mass spectra) by light blue triangles. Each component indicates the percentage of the variability of the data that is explained

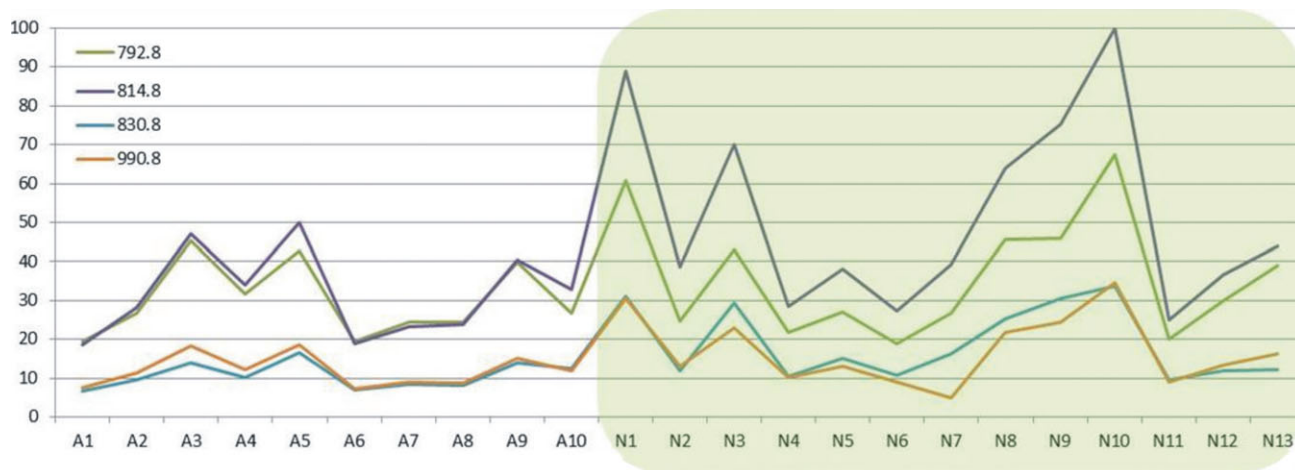
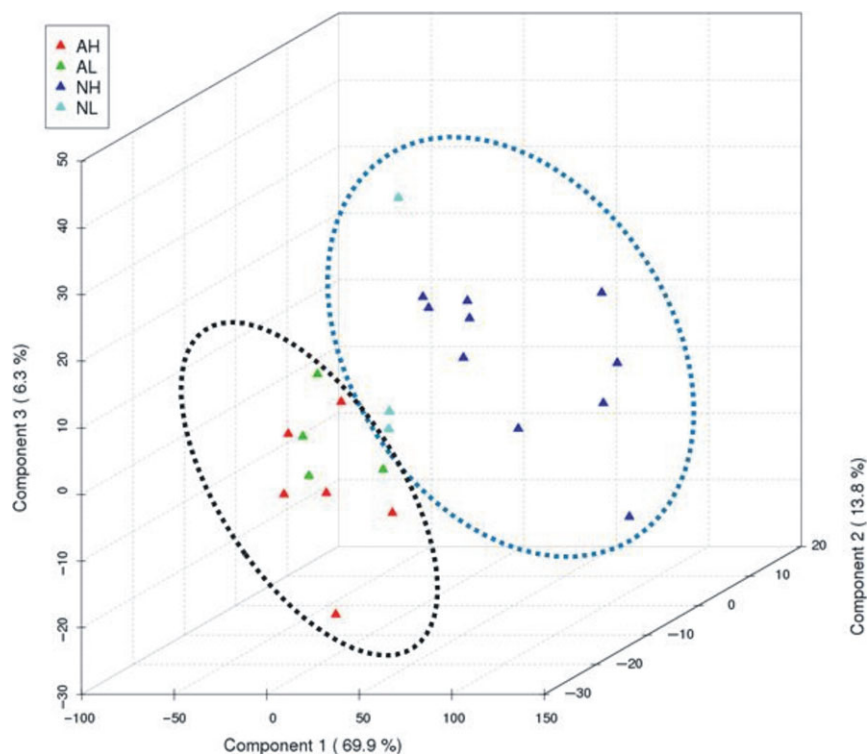


Fig. 4. Line graphic showing the relative ion abundances (y-axis) in the lipid mass spectra of each sample of *1/2 indicus* × *taurus* (AH group samples: A1 to A6; AL group samples: A7 to A10) and *indicus* (NH group: N1 to N10; NL group: N11 to N13)

respective relative ion abundances in individual samples (Fig. 4). Figure 5 shows representative spectra for the four experimental groups.

Discussion

Herein, we report the first comparative MALDI-MS-based study of lipid profiles of immature oocytes recovered by OPU from *B. indicus* and *1/2 indicus* × *taurus* females with remarkably high or low antral follicle count/oocyte yield.

Lipids have been studied and may represent reliable biomarkers for oocyte development because they play many significant roles, such as energy storage and cell structure (by tuning the physical properties of the cell; Kim et al. 2001). In the present study, independent of

the breed and oocyte yield/antral follicle count, COCs from pre-antral follicles and expanded oocytes tended to be separated from the other groups (Fig. 1) due to substantial differences in their lipid profiles. COCs from expanded oocytes presented high abundance of some ions that were in lower abundance in COCs from pre-antral follicles. Conversely, the ion that was present in low quantity in COCs from expanded oocytes presented higher abundance in COCs from pre-antral follicles (Fig. 2). These changes in lipid molecular design observed in the COCs from pre-antral follicles could be related to metabolic status, reduced cytoplasmic membrane content or membrane specialization in oocytes at growing stages compared with oocytes in the antral follicles, because differences in the lipid profile between COCs from pre-antral or

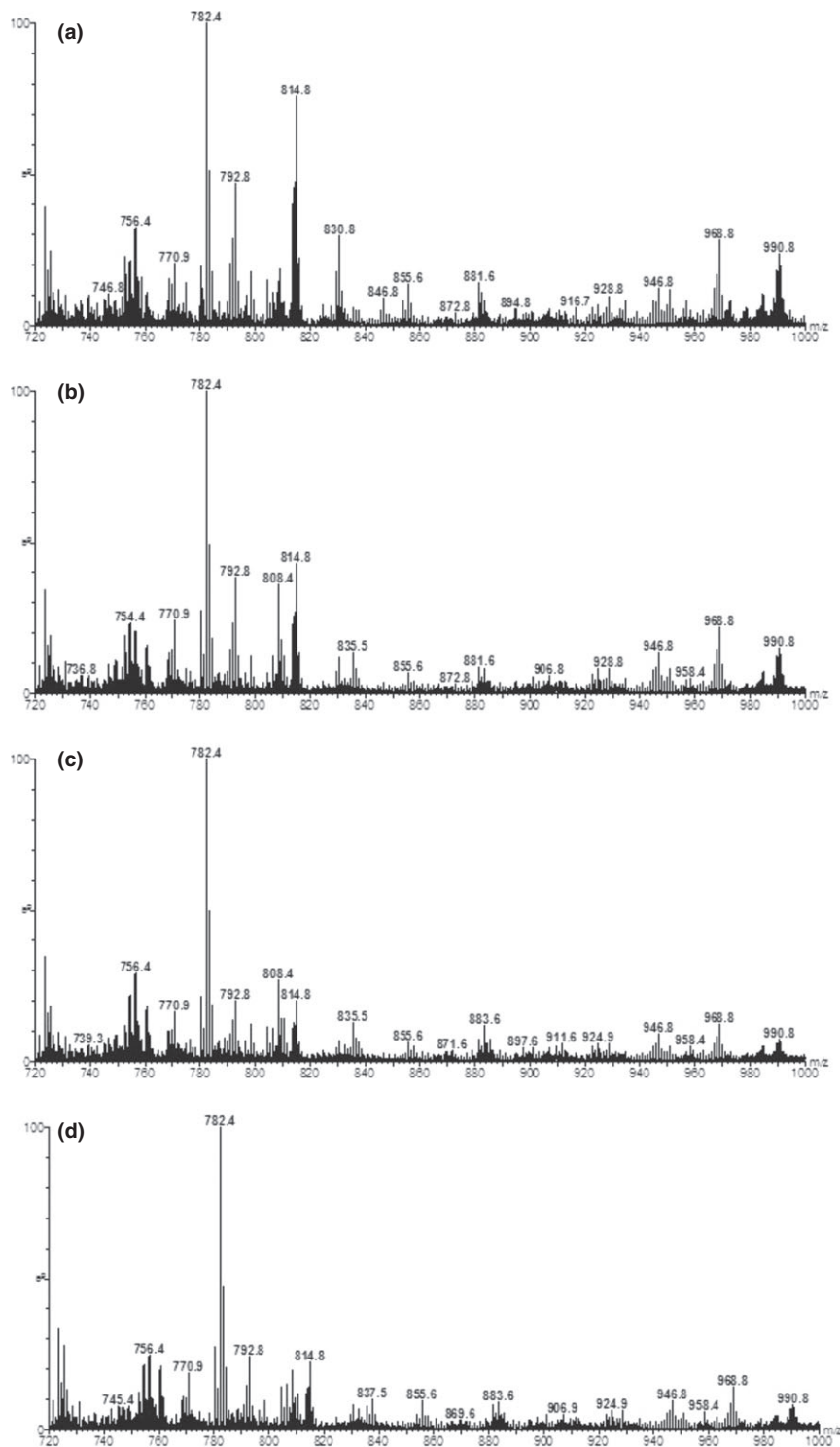


Fig. 5. Representative MALDI-MS of the (a) NH group; (b) NL group; (c) AH group; and (d) AL group

expanded follicles were mainly related to the PC lipid species.

Large amounts of intracellular lipids, represented by lipid droplets, are present in the oocyte cytoplasm (Kim et al. 2001). Lipid droplets store neutral lipids, such as TAG, and are surrounded by a monolayer of phospholipids and associated proteins (Bartz et al. 2007). Indeed, the majority of the intracellular lipids in oocytes are TAG (Homa et al. 1986; McEvoy et al. 2000). A metabolic role of TAG in the *in vitro*

maturation of pig and bovine oocytes has been demonstrated (Ferguson and Leese 1999; McEvoy et al. 2000), which indicates that oocytes may use lipids as an energy source, providing ATP for the protein synthesis that is necessary for the continuation of cytoplasmic maturation and meiosis (Kruip et al. 1983). During *in vitro* maturation, the TAG content of pig oocytes decreases (Sturmeijer and Leese 2003). Similarly, higher amounts of triglyceride have been measured in immature oocytes compared with *in vitro*

matured oocytes (Kim et al. 2001; Ferguson and Leese 1999). Conversely, a study has found no lipid variation in bovine oocytes after *in vitro* maturation (Aardema et al. 2008).

TAG can also be used as a source of energy during early embryo development (Hillman and Flynn 1980; Waterman and Wall 1988; Khandoker and Tsujii 1998; Spindler et al. 1999; Gomez et al. 2001, 2002). It was reported that *in vitro*-produced bovine zygotes were able to cleave in the complete absence of exogenous nutrients (Ferguson and Leese 1999). Indeed, substrate oxidation by five- to eight-cell embryos was continuous (Ferguson and Leese 2006), which suggests the use of lipid internal stores. In the present study, the oocytes of *indicus* females clustered separately from the oocytes of 1/2 *indicus* × *taurus*, particularly the NH group, when only the GI, II and III oocytes were considered, whereas the 1/2 *indicus* × *taurus* oocytes (AH and AL groups) were mixed (Fig. 3). This difference was due mainly to the greater abundance of four ions in the NH and NL groups compared with the AH and AL groups, most of them corresponded to PC lipid species (Fig. 4). These findings indicate different metabolic rates among *indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* oocytes and that *indicus* females with high AFC/oocyte yields have an energy store advantage over 1/2 *indicus* × *taurus* donors with high and low oocyte yields. These PC lipid species may be associated with lipid droplets and other cellular membranes and have an active role in the metabolism of stored lipids during oocyte maturation.

A recent study (Pontes et al. 2011) demonstrated that oocytes recovered by OPU from *indicus* donors with high oocyte production produced significantly more embryos and more pregnancies compared with females with low oocyte production. The greater abundance of the four lipid ions observed in the present study could be related to the differences between *indicus* donors with high and low oocyte yields reported by Pontes et al.

(2011). However, great variation in the lipid droplet number in oocytes from the same ovary has been observed (Aardema et al. 2008).

Because PC lipids are involved in the bilayer membrane structure, the present results indicate membrane structural differences between *indicus* and 1/2 *indicus* × *taurus* oocytes from females with high and low AFC/oocyte yields. The physiological significance of the greater abundance of the four lipid species in *indicus* oocytes compared with 1/2 *indicus* × *taurus* oocytes could be related to membrane metabolic rate differences and may contribute to oocyte competence and embryo development. The results also suggest that expanded oocytes may have lipid metabolic changes related to pre-ovulation. This intriguing possibility will be further investigated by MALDI-MS with a larger set of samples.

Acknowledgements

The authors thank the ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Post-Graduation Program in Animal Science at the State University of Londrina and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Katia Cristina Silva-Santos – writing, COCs selection and classification, Christina Ramires Ferreira – mass spectrometry and data analyses, Marcos Nogueira Eberlin – mass spectrometry, Gustavo Martins Gomes dos Santos – ultrasonograph, OPU Letícia Schmidt Siloto – OPU, COCs processing Camila Oliveira Rosa – OPU, COCs processing, Thiago Nogueira Marcantonio – ultrasonograph, OPU Marcelo Marcondes Seneda – supervisor.

References

- Aardema H, Knijn HM, Oei CHY, Vos PLAM, Gadella BM, 2008: Lipid droplet dynamics during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* **43**, 76. (Abstract).
- Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BA, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB, Gadella BM, 2011: Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod* **85**, 62–69.
- Apparicio M, Ferreira CR, Tata A, Santos VG, Alves AE, Mostachio GQ, Pires-Butler EA, Motheo TF, Padilha LC, Pilau EJ, Gozzo FC, Eberlin MN, Lo Turco EG, Luvoni GC, Vicente WR, 2012: Chemical composition of lipids present in cat and dog oocyte by matrix-assisted desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Reprod Domest Anim* **47**, 113–117.
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, Chapman KD, 2007: Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* **48**, 837–847.
- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ, 2005: 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* **73**, 53–62.
- Castaneda CA, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Norman S, Fry R, D'Occhio MJ, 2013: Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology* **79**, 417–422.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M, 2002: Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* **124**, 675–681.
- Cummins J, 2004: The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **115**, 23–29.
- Edidin M, 2003: Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414–418.
- Ferguson EM, Leese HJ, 1999: Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* **116**, 373–378.
- Ferguson EM, Leese HJ, 2006: A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* **73**, 1195–1201.
- Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, Santos LF, Lo Turco EG, Pontes JH, Basso AC, Bertolla RP, Sartori R, Guardieiro MM, Perecin F, Meirelles FV, Sangalli JR, Eberlin MN, 2010: Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res* **51**, 1218–1227.
- Ferreira CR, Pirro V, Eberlin LS, Hallett JE, Cooks RG, 2012a: Developmental phases of individual mouse preimplantation embryos characterized by lipid signatures using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **404**, 2915–2926.
- Ferreira CR, Eberlin LS, Hallett JE, Cooks RG, 2012b: Single oocyte and single embryo lipid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **47**, 29–33.
- Fleming TP, Saacke RG, 1972: Fine structure of the bovine oocyte from the mature

- graafian follicle. *J Reprod Fertil* **29**, 203–212.
- Gomez E, Duque P, Díaz E, Díez C, 2001: Effects of acetoacetate on in vitro development of bovine embryos in medium containing citrate and myo-inositol. *Reprod Domest Anim* **36**, 189–194.
- Gomez E, Duque P, Díaz E, Facal N, Antolín I, Hidalgo C, Díez C, 2002: Effects of acetoacetate and D-beta-hydroxybutyrate on bovine in vitro embryo development in serum free medium. *Theriogenology* **57**, 1551–1562.
- Hillman N, Flynn TJ, 1980: The metabolism of exogenous fatty acids by pre-implantation mouse embryos developing in vitro. *J Embryol Exp Morphol* **56**, 157–168.
- Homa ST, Racowsky C, McGaughey RW, 1986: Lipid analysis of immature pig oocytes. *J Reprod Fertil* **77**, 425–434.
- Hulbert AJ, 2003: Life, death and membrane bilayers. *J Exp Biol* **206**, 2303–2311.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T, 1997: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **47**, 23–32.
- Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ, 2008: Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* **79**, 1219–1225.
- Khandoker MAMY, Tsujii H, 1998: Metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation rabbit embryos. *Jpn J Fertil Steril* **43**, 195–201.
- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y, 2001: Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* **122**, 131–138.
- Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden TH, Dieleman SJ, 1983: Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res* **8**, 29–47.
- Lowman BG, Scott NA, Somerville SH, 1976: Condition Scoring of Cattle, Rev. Ed. East Scotland College of Agriculture, Edinburgh, Scotland, pp. 1–31 (Bulletin 6).
- Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Matos LF, Wolf E, Gonçalves PBD, 2006: The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology* **65**, 573–583.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK, 2000: Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* **118**, 163–170.
- McKeegan PJ, Sturmev RG, 2011: The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod Fertil Dev* **24**, 59–67.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM, 2009: Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* **71**, 690–697.
- Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM, 2010: Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* **74**, 1349–1355.
- Pontes JHF, Melo-Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM, 2011: Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* **75**, 1640–1646.
- Spindler RE, Renfree MB, Shaw G, Gardner DK, 1999: Reactivating tammar wallaby blastocysts oxidise fatty acids and amino acids. *J Reprod Fertil* **115**, 79–86.
- Sturmev RG, Leese HJ, 2003: Research energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* **126**, 197–204.
- Sturmev RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG, 2009: Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim* **44**, 50–58.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD, 2012: Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod* **87**, 1–11.
- Tarazona AM, Rodriguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M, 2006: Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim* **41**, 5–11.
- Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S, 2002: Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod* **17**, 393–406.
- Waterman RA, Wall RJ, 1988: Lipid interactions with in vitro development of mammalian zygotes. *Gamete Res* **21**, 243–254.
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS, 2009: MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* **37**, 652–660.
- Xia J, Sinelnikov IV, Wishart DS, 2011a: MetATT: a web-based metabolomics tool for analyzing time-series and two-factor datasets. *Bioinformatics* **2**, 2455–2456.
- Xia J, Wishart DS, 2011b: Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protoc* **6**, 743–760.
- Xia J, Wishart DS, 2011c: Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. In: Baxevanis AD (ed.), *Current Protocols in Bioinformatics*. Wiley, New York, NY. Chapter 14, Unit 14.10.
- Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS, 2012: MetaboAnalyst 2.0 – a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* **40**, 127–133.

Submitted: 16 Dec 2013; Accepted: 14 May 2014

Author's address (for correspondence): Marcelo Marcondes Seneda, Laboratório de Reprodução Animal (ReproA), DCV-CCA-Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR 86051-990 Brazil. E-mail: mseneda@uel.br