



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA SCHMIDT SILOTO

**COMPARAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO FOLICULAR
OVARIANA ANTRAL E PRÉ-ANTRAL DE FÊMEAS BOS
INDICUS E ½ BOS INDICUS X BOS TAURUS**

LETICIA SCHMIDT SILOTO

**COMPARAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO FOLICULAR
OVARIANA ANTRAL E PRÉ-ANTRAL DE FÊMEAS BOS
INDICUS E ½ BOS INDICUS X BOS TAURUS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S585c Siloto, Leticia Schmidt.

Comparação entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de fêmeas *Bos indicus* A *Bos indicus* X *Bos taurus* / Leticia Schmidt Siloto . - Londrina, 2012.

41f. : 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, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Folículos ovarianos - Teses. 2. Folículos pré-antrais - Teses. 3. Vacas - Desenvolvimento folicular - Tese s. 4. Folículos antrais - Teses. 5. Nelore (Zebu) - 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

LETICIA SCHMIDT SILOTO

**COMPARAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA
ANTRAL E PRÉ-ANTRAL DE FÊMEAS BOS INDICUS E ½ BOS
INDICUS X BOS TAURUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Ciência
Animal da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr^a Fabiana de A. Melo Sterza
UEMS – Campo Grande – MS

Dr^a Livia Aires Lisboa
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador que me deu a oportunidade de executar esse e outros trabalhos que serviram e servirão para meu crescimento pessoal e profissional.

A Kátia e ao Gustavo, a quem tenho muito a agradecer pelo desprendimento, dedicação, ajuda, pelo trabalho, pelo fornecimento dos dados, pelo conhecimento que me proporcionaram e principalmente pela amizade. Agradecer a Kátia por contribuir ainda mais com o trabalho participando da qualificação.

A Dr^a Livia pela contribuição durante a qualificação e por aceitar participar da banca de defesa.

A professora Dr^a Fabiana por aceitar participar da banca de defesa.

Aos meus companheiros de equipe do Laboratório de Reprodução Animal da UEL que me ajudaram, ensinaram e me acompanharam até esse momento.

Aos funcionários, professores e colegas da pós-graduação que fizeram parte, de alguma forma, dessa etapa da minha vida a qual foi muito importante para mim.

A EMATER-PR, instituto que me acolheu de braços abertos como a uma "filha" ou "neta", me proporcionando a oportunidade de aprender no campo as alegrias e as mazelas do pequeno produtor rural. Lugar onde fiz bons amigos (Leili, Carol, Eros, Elton) que apesar do pouco tempo que passamos juntos me incentivaram e incentivam principalmente em relação a essa etapa da minha vida (mestrado). Em especial agradeço ao escritório local de Pitanga, onde tive o prazer de trabalhar por um ano, aos companheiros de trabalho e amigos dos quais sinto muita saudade: Amilcar, Ari (in memoriam), Cilmara, Cristiano, D^a Tereza, Neudi, Rose e Vilmar.

Aos meus amigos que estiveram comigo durante toda a minha caminhada. Uns perto outros longe, mas sempre juntos e torcendo por mim.

A Fre, uma grande amiga, que sempre está ao meu lado me incentivando, me escutando e me ensinando todos os dias da nossa convivência.

Ao Roberto, pelo seu otimismo, sua confiança em mim, apoio e amor; que me ajudam a ser forte e pensar que as coisas boas vêm para ficar e as ruins são fases pelas quais temos que passar e passarão.

A minha família cheia de emoção (Daddy, Mama, Patty, Ato, Meme, Gu, Pipe, Marianna e Simone). Agradeço por serem meu exemplo para que eu nunca desista dos meus objetivos, para que eu procure ser uma pessoa boa, justa, batalhadora, humilde e muito feliz. Agradeço o apoio, o incentivo, o abraço, o beijo, o colo, a risada, a lágrima, a saudade, a crítica, o conselho, a proteção e o grande amor que nunca me falta.

E agradeço a Deus por todas essas pessoas, e por outras que cruzarão o meu caminho, que me fazem ter todos os dias motivos para aprender e agradecer.

Obrigada!

SILOTO, Leticia Schmidt. *Comparação entre a população folicular ovariana antral e pré-antral em fêmeas Bos indicus e % Bos indicus X Bos taurus*. 2012. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a população folicular ovariana antral e pré-antral de vacas Nelore (*indicus*) e V2 NeloreXAngus (*indicus-taurus*). Fêmeas *indicus* (n=20) e *indicus-taurus* (n=20) foram submetidas à aspiração folicular em dia aleatório do ciclo estral (D0), a fim de promover a ablação de todos os folículos >3mm e o início de uma nova onda de crescimento folicular. Em seguida foram submetidas à avaliações ultrassonográficas por cinco dias (D4, D19, D34, D49 e D64) para contagem dos folículos antrais (CFA) >3mm de diâmetro. Com base nesses dados as vacas foram separadas em grupos de alta CFA (animais com média de folículos antrais >30 folículos; *indicus* n=7, *indicus-taurus* n=6) e baixa CFA (animais com média de folículos antrais <15 folículos; *indicus* n=6, *indicus-taurus* n=6). Após o último dia de avaliação (D64), os animais foram levados ao abate para obtenção dos ovários e posterior processamento histológico para estimar a população folicular ovariana pré-antral. Apenas um ovário de cada animal foi avaliado. Buscou-se correlacionar a média de folículos antrais com a quantificação de folículos pré-antrais. Houve padrão de repetibilidade no número de folículos antrais por indivíduo durante as avaliações para os grupos de alta e baixa CFA. A média de folículos antrais (média±DP) foi 35±9 (*indicus*) e 38±6 folículos (*indicus-taurus*) para fêmeas de alta CFA, e 10±3 (*indicus*) e 12±2 folículos (*indicus-taurus*) para as de baixa CFA. Houve grande variação na quantidade de folículos pré-antrais entre indivíduos do mesmo grupo e entre as raças. O número médio de folículos pré-antrais nos ovários de *indicus-taurus* de alta CFA (116226±83156 folículos) foi maior (P<0,05) comparado a *indicus* de alta CFA (63032±58705 folículos). Entretanto, não houve diferença (P>0,05) entre *indicus* (28324±24525 folículos pré-antrais) e *indicus-taurus* (85748±129628 folículos) de baixa CFA. A média de folículos pré-antrais em *indicus* de alta CFA não diferiu (P>0,05) de *indicus-taurus* de baixa CFA. Não houve correlação entre folículos antrais e pré-antrais. Conclui-se que o grau de sangue *indicus* e a raça taurina utilizada podem ter contribuído para as diferenças encontradas entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de Nelore e 1/2 NeloreXAngus.

Palavras-chave: Folículo gênese. Folículos antrais. Folículos pré-antrais. *Bos indicu*. *Bos taurus*.

SILOTO, Leticia Schmidt. *Comparative study between antral and preantral ovarian follicle population in Bos indicus and % Bos indicus x Bos taurus females*. 2012. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare antral and preantral ovarian follicle population in cows Nelore (*indicus*) and % NeloreXAngus (*indicus-taurus*). *Indicus* females (n = 20) and *indicus-taurus* (n = 20) underwent follicular aspiration on a random day of the estrous cycle (D0) in order to promote the ablation of all follicles > 3 mm and the beginning of a new wave of follicular growth. Then, the cows were subjected to ultrasonographic evaluations for five days (D4, D19, D34, D49 and D64) in order to count the antral follicles (CFA) > 3 mm in diameter. Based on these data the cows were separated into groups of high CFA (animals with an average of antral follicles > 30 follicles; *indicus*, n = 7, *indicus-taurus*, n = 6) and low CFA (animals with an average of < 15 antral follicles; *indicus* n = 6, *indicus-taurus* n = 6). After the final evaluation day (D64), the animals were taken to slaughter for obtaining the ovaries and subsequent histological processing to estimate the preantral ovarian follicle population. Only one ovary of each animal was evaluated. We tried to correlate the average of antral follicles with the quantification of preantral follicles. There was a repeatability in the numbers of antral follicles during follicular waves per individual of high and low AFC. The mean number of antral follicles (mean±SD) was 35±9 (*indicus*) and 38±6 follicles (*indicus-taurus*) for the high AFC group, and 10±3 (*indicus*) and 12±2 follicles (*indicus-taurus*) for the low AFC. A large variation in numbers of preantral follicles was observed among individuals within the same group and between breeds. The mean number of preantral follicles in *indicus-taurus* of high AFC (116,226±83,156 follicles) was greater (P<0.05) compared to *indicus* (63,032±58,705 follicles). However, there was no difference (P>0.05) between the average number of preantral follicles of *indicus* (28,324±24,525 pre-antral follicles) and *indicus-taurus* (85,748±129,628 follicles) of low AFC. The average number of preantral follicles from *indicus* of high AFC did not differ (P>0.05) from that of *indicus-taurus* of low AFC. There was no correlation between antral and preantral follicles. We conclude that both the influence of *indicus* cattle and the *taurus* breed may contributed for differences between Nelore and 1/2 NeloreXAngus in numbers of antral and preantral follicles.

Keywords: Folliculogenesis. Antral follicles. Preantral follicles. *Bos indicus*. *Bos taurus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** –Esquema de ovário, mostrando seus principais componentes: epitélio germinativo, túnica albugínea, região cortical, região medular, artérias e veias, folículos primordiais, folículo primário, folículo secundário, folículo antral pré-ovulatório..... 14
- Figura 2** –Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais 15
- Figura 3** –Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers et al., 1999). A. Folículo Primordial; B. Folículo Primário; C. Folículo Secundário; D. Folículo Terciário; E. Folículo Pré-ovulatório. 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário 19

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** –Número médio (média \pm DP) de folículos antrais por ovário de vacas *Bos taurus indicus* e V2 *Bos taurus indicus* x V2 *Bos taurus taurus* de alta e baixa Contagem Folicular Antral (CFA), avaliadas por ultrassonografia..... 34
- Tabela 2** –Média (\pm DP) de folículos pré-antrais e antrais de vacas *Bos taurus indicus* e V2 *Bos taurus indicus* x V2 *Bos taurus taurus* de alta contagem de folículos e baixa contagem de folículos 35

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	Hormônio anti-Mülleriano
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BMP15	Proteína Morfogenética Óssea
CFA	Contagem de Folículos Antrais
CL	Corpo Lúteo
CTSB	Determinantes da Capacidade Oocitária em Células do Cumulus
CYP19A1	Gene Ligado à Produção de Estradiol pelas Células da Granulosa
ESR1 e ESR2	Gene Ligado à resposta do Estradiol
FGF8	Fator de Crescimento Fibroblástico 8
FOPA	Foliculos Ovarianos Pré-Antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF9	Fator de Crescimento de Diferenciação 9
GDF9b	Fator de Crescimento de Diferenciação 9b
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
KL	Kit Ligand
LH	Hormônio Luteinizante
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
TBC1D1	Gene Ligado à Diferenciação de Função das Células da Teca
TE	Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 OVÁRIO.....	13
2.1.1 Morfologia e Estrutura do Ovário.....	13
2.1.2 População Folicular Ovariana.....	14
2.2 OÓGENESE.....	14
2.3 FOLICULOGÊNESE.....	16
2.3.1 Folículos Ovarianos	16
2.3.2 Folículos Pré-Antrais	17
2.3.3 Folículos Antrais	18
2.4 ATRESIA FOLICULAR	19
2.5 FISILOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS	20
3 HIPÓTESE	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
REFERÊNCIAS	24
5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	29
5.1 INTRODUÇÃO.....	30
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.2.1 Animais.....	31
5.2.2 Processamento Histológico.....	32
5.2.3 Folículos Ovarianos	32
5.2.4 Estimativa Folicular	33
5.2.5 Análise Estatística.....	33
5.3 RESULTADOS.....	34
5.4 DISCUSSÃO.....	36
5.5 REFERÊNCIAS	38
CONCLUSÃO	41

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo. Aproximadamente 80% deste rebanho é constituído de animais *Bos taurus indicus*, dos quais se destaca a raça Nelore (Pontes et al., 2010). Esses animais em sessões de aspiração folicular demonstram uma alta taxa de recuperação de oócitos comparado a animais das raças européias. Essa característica do rebanho brasileiro contribui para que o Brasil seja um dos líderes na produção *in vitro* de embriões (Pontes et al., 2011).

Com o intuito de um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo do rebanho, pesquisas básicas e moleculares auxiliam no aprimoramento de biotécnicas tais como produção *in vitro* de embriões (PIVE), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transgenia e clonagem.

Neste contexto, o estudo de temas como a foliculogênese, a oôgenese e o desenvolvimento embrionário ganhou destaque nos últimos anos (Caixeta et al., 2010). O modelo bovino para o estudo da foliculogênese já está bem caracterizado, porque esta espécie apresenta longo ciclo estral com múltiplas ondas foliculares estimuladas por diferentes hormônios. Em todas as ondas de crescimento folicular ocorrem fenômenos de crescimento folicular e atresia (Ginther et al., 1996; Ireland et al., 2000). O que torna o desenvolvimento folicular nessa espécie facilmente avaliado por ultrassonografia.

Em sessões de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) a taxa de recuperação de oócitos é maior em fêmeas zebuínas (média de 18-25 oócitos; Pontes et al., 2011; Thibier, 2004; Watanabe et al., 1999) do que para taurinas (média é de 4-14 oócitos; Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins Jr et al., 2007). Há relatos de 251 (Seneda et al., dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento de aspiração folicular (Santos et al., 2005). Em animais cruzados *indicus X taurus* a recuperação oocitária foi de 21 oócitos para animais VV Holandes X % Gir e 31 oócitos para animais % Holandes X Gir (Pontes et al., 2010). Também já foi demonstrado que quanto maior o grau de sangue *Bos indicus*, maior a obtenção de oócitos *in vivo* (Rubin et al., 2005).

Como uma possibilidade de encontrar respostas para a diferença na taxa de recuperação oocitária entre fêmeas zebuínas e taurinas, pesquisas voltadas para a população folicular têm sido realizadas (Seneda et al., 2010). Silva-Santos et al. (2011), estimaram a população folicular pré-antral em fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* e não verificaram diferença significativa no número de folículos entre fetos, novilhas e vacas. No entanto há uma alta variabilidade individual no número de folículos pré-antrais entre fêmeas

independente de raça ou estágio reprodutivo (Tanaka et al., 2001; Erickson, 1966 a,b; Silva-Santos et al., 2011), entretanto, não existem relatos sobre a influência dessa variação individual sobre o número de folículos pré-antrais sobre a quantidade de folículos antrais recrutados durante o ciclo estral (Burns et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi comparar o número de folículos antrais com a população folicular pré-antral em ovários de vacas *Bos taurus indicus* e % *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIO

2.1.1 Morfologia e Estrutura do Ovário

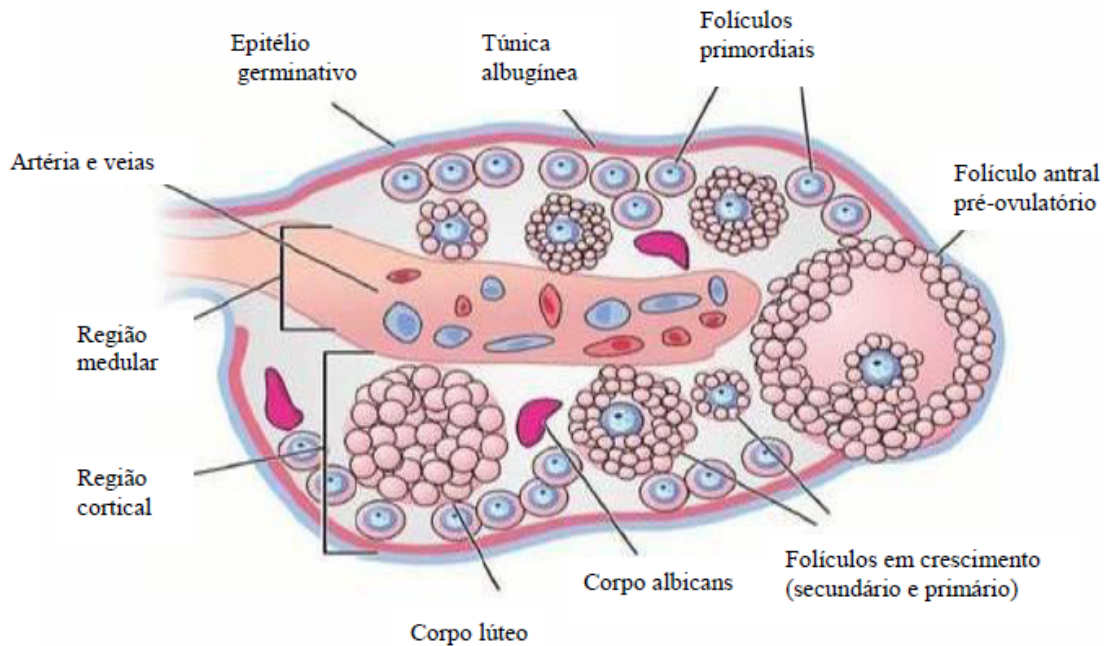
O ovário possui formato e tamanho que variam dependendo da espécie animal e com a fase do ciclo estral. Em bovinos o ovário tem forma de amêndoa, o comprimento varia de 3,0 a 4,5 cm, a largura de 1,5 a 2,0 cm e a "profundidade" de 2,0 a 2,8 cm, (Hafez, 1995).

O ovário é dividido em duas regiões, medular e cortical (Figura 1). Ele desempenha funções exócrinas (liberação de óvulos) e endócrinas (esteroidogênese). Sua superfície é circundada por um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, o epitélio germinativo. Sob o epitélio germinativo há uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea e então o estroma ovariano (Junqueira et al., 2008).

Logo abaixo da túnica albugínea, no estroma ovariano, encontra-se a região cortical (Figura 1), a qual é composta por colágenos dos tipos i e iii, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (Hafez & Hafez, 1995). No tecido conjuntivo da região cortical predominam os folículos ovarianos, que contêm os oócitos ou ovócitos. Em animais que estão ciclando, os folículos podem ser quiescentes, em desenvolvimento ou atresícos. São encontrados ainda na cortical, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos (Murdoch et al., 1996).

A parte mais interna do ovário é a região medular (Figura 1), que contém tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo i e iii), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. É responsável pela nutrição e sustentação do ovário (Hafez, 2004).

Figura 1 –Esquema de ovário, mostrando seus principais componentes: epitélio germinativo, túnica albugínea, região cortical, região medular, artérias e veias, folículos primordiais, folículo primário, folículo secundário, folículo antral pré-ovulatório.



Fonte: <http://dc376.4shared.com/doc/Zi6FscUE/preview.html>

2.1.2 População Folicular Ovariana

Estima-se que a população de folículos ovarianos ao nascimento de fêmeas bovinas seja de aproximadamente 235.000 folículos por ovário, podendo variar de 0 a 720.000 folículos por ovário (Betteridge et al., 1989). Em outras espécies, foram encontrados aproximadamente 160.000 folículos pré-antrais na ovelha (Driancourt, 1991), e 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986). Além da variação individual, vários fatores como espécie, raça (Cahill et al., 1979), genética (Erickson, 1966; Smith et al., 1994), idade, níveis hormonais (Rüsse et al., 1983) e estado reprodutivo do animal (Erickson et al., 1976) podem influenciar a população e distribuição dos folículos ovarianos.

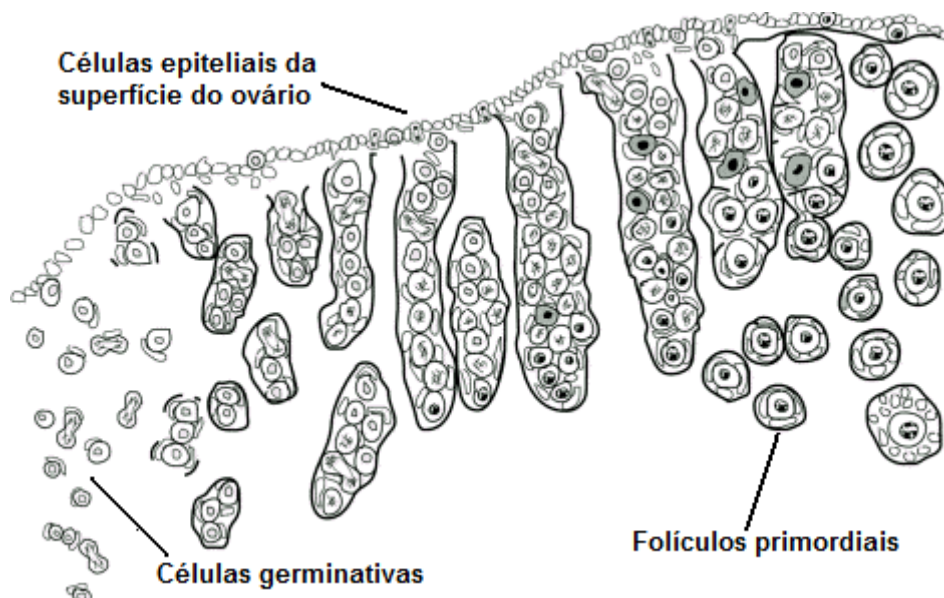
2.2 OÓGENESE

A formação dos folículos e dos oócitos contidos nestes, começa durante a vida embrionária. Em ruminantes, a oogênese pode ser definida como o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, culminando com a formação do oócito haplóide fecundado (Rüsse et al., 1983). Células germinativas primordiais têm origem

extragonadal, e migram do saco vitelínico para o mesênquima da crista genital. Nesse local, as células germinativas primordiais sofrem diversas divisões mitóticas, dentro do ovário multiplicam-se ativamente e diferenciam-se em oogônias. Nesta etapa, células somáticas do mesonefron circundam as oogônias, formando os cordões corticais, precursores dos folículos primordiais (Figura 2). As oogônias sofrerão sucessivas divisões mitóticas e então entrarão na primeira divisão meiótica, estacionando em estágio de prófase I (Soto-Suazo; Zorn, 2005; Van Den Hurk; Zhao, 2005), sendo denominados de oócitos ou ovócitos.

Até o animal atingir a puberdade o oócito encontra-se estacionado no diplóteno da prófase I. O processo de meiose é retomado em resposta à estimulação pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH; Buccione et al., 1990), passando em seguida pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, ocorrendo a liberação do 1º corpúsculo polar e formação do oócito secundário (Betteridge et al., 1989). O processo de maturação meiótica, *in vivo*, pode ocorrer apenas no oócito do folículo pré-ovulatório dominante e resulta, dentre outros fatores, da estimulação específica pelo pico pré-ovulatório de LH (Erickson, 1986).

Figura 2 –Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais.



Fonte: adaptado de Juengel et al. (2002).

No estágio de metáfase II, ocorre uma segunda interrupção da meiose (Betteridge et al., 1989). Na maioria das espécies domésticas, o oócito permanece em metáfase II até ser ovulado e transportado para o oviduto, onde poderá vir a ser fecundado.

Caso a fecundação ocorra, o oócito retoma a meiose (Betteridge et al., 1989; Buccione et al., 1990) que culmina com a extrusão do segundo corpúsculo polar (Gordon, 1994), marcando assim o fim da oogênese.

2.3 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório (Saumande, 1981).

2.3.1 Folículos Ovarianos

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). Desempenham duas funções principais, uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e outra exócrina ou gametogênica (Figueiredo et al., 2002).

Na fase gametogênica, o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, para assegurar o crescimento e a maturação de oócitos primários ou imaturos e para liberar um oócito maduro no processo de ovulação (Figueiredo et al., 2002).

A população dos folículos ovarianos é bastante heterogênea e encontra-se na região cortical do ovário. Os folículos podem ser divididos de acordo com o grau de evolução em folículos pré-antrais ou não cavitários e folículos antrais ou cavitários.

A formação dos folículos ovarianos ocorre ainda na fase fetal. Os folículos primordiais constituem o *pool* de reserva de folículos quiescentes (Beckers et al., 1996) e compreendem 90% dos oócitos presentes nos ovários (Erickson, 1986); são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (Guilbault et al., 1986). No desenvolvimento dos folículos primordiais e primários atuam fatores de crescimento. Resultados obtidos em animais de laboratório sugerem que fatores como *kit ligand* (KL), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), hormônio anti-Mülleriano (AMH) e fator de crescimento do nervo (NGF), participam da regulação do reinício do desenvolvimento de folículos primordiais (Fortune et al., 2003). Em folículos primários, o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), o GDF-9b e a proteína morfogenética óssea (BMP 15) são

essenciais para se continuar o desenvolvimento do folículo para atingir o estágio de folículo secundário (Galloway et al., 2000).

No entanto, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais presentes nos ovários não chegam até a ovulação (Carrol et al., 1990), sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia. Por isso, o ovário pode ser considerado um órgão de baixíssima produtividade (Ireland, 1987).

2.3.2 Folículos Pré-antrais

Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários. Eles diferenciam-se entre si pela forma e pelo número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito imaturo (Figueiredo et al., 2002; Figura 3). Os folículos pré-antrais podem ser classificados também de acordo com o grau de viabilidade em folículos saudáveis (com lâmina basal intacta, oócito com não mais de três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolos intactos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação da cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente; Butler, 1970; Wandji et al., 1996, a,b).

Os folículos primordiais são os menores folículos encontrados no ovário. Em bovinos seu diâmetro é de 35,2µm (McNatty et al., 2000). São os primeiros a serem formados e consistem em um oócito imaturo circundado por uma camada de células achatadas, denominadas células da pré-granulosa ou folicular. Seu núcleo é grande e claro, com a cromatina dispersa (Junqueira & Carneiro, 2004). Possuem nucléolo esférico e bem evidente. As organelas são uniformemente distribuídas no citoplasma ou bem próximas ao núcleo. As mitocôndrias são as mais evidentes. O complexo de Golgi migra para as proximidades da membrana do oócito (Lucci et al., 2001).

Com o início do desenvolvimento dos folículos primordiais começa a diferenciação dos folículos. As células, que eram de formato pavimentoso, passam para cubóides (Hulshof et al., 1994), presentes em maior quantidade e mais volumosas (Van Den Hurk et al., 1997), caracterizando o folículo primário. O folículo primário em bovinos mede 55,1µm (McNatty et al., 2000). É nessa fase que há o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida até o final do desenvolvimento folicular (Figueiredo et al., 2002). Assim como nos folículos primordiais, o citoplasma dos oócitos dos folículos primários

também contém numerosas mitocôndrias arredondadas. Com o desenvolvimento do folículo, a mitocôndria torna-se alongada (Lucci et al., 2001).

Ainda com o aumento do folículo e multiplicação do número de células, o folículo passa de uma camada de células para duas ou mais, sendo denominado folículo secundário (Hulshof et al., 1994). Os pequenos folículos secundários possuem diâmetro de 81µm, podendo os grandes, atingirem 200µm em diâmetro (Figueiredo et al., 2002). Em folículos secundários o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica, situando-se na região entre a zona pelúcida e o centro do oócito. As organelas também se movem e ficam mais próximas à periferia (Hyttel et al., 1997). O retículo endoplasmático liso aumenta de tamanho e a grande maioria das mitocôndrias são alongadas (Lucci et al., 2001). Nos folículos secundários, mais avançados, há o aparecimento das células da teca recrutadas de precursores tecais presentes no estroma ovariano (Parrott et al., 2000).

2.3.3 Folículos Antrais

O desenvolvimento folicular continua até que se forme uma cavidade única contendo líquido, o líquido folicular, chamada de antro folicular. A formação do antro folicular caracteriza a passagem de folículos pré-antrais em antrais (Junqueira; Carneiro, 2004; Figura 3). A partir daí, os folículos podem seguir dois caminhos: ovulação ou atresia. A maioria dos folículos (99,9%) sofre um processo degenerativo ou apoptótico, denominado atresia folicular (Ireland, 1987). Dessa forma, a vida útil reprodutiva da fêmea torna-se menor, pois normalmente somente um em cada 1000 folículos primordiais atingirá o estágio de folículo pré-ovulatório (Junqueira; Carneiro, 2004).

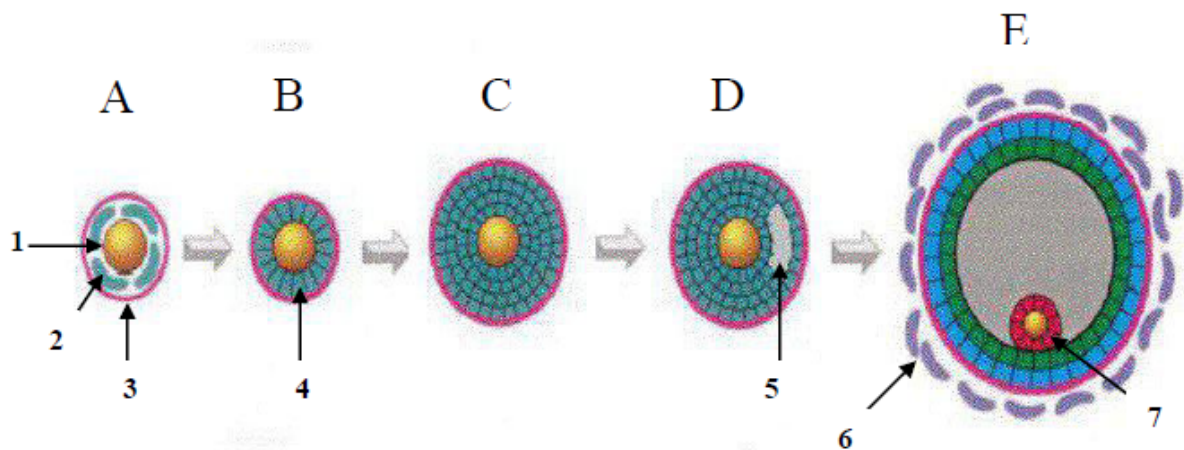
O início da formação de antro em bovinos é observado quando os folículos atingem 250µm (McNatty et al., 2000). Os folículos crescem em tamanho e o diâmetro dos folículos primordiais aumenta de 0,020-0,040 mm (bovinos) para mais de 10 mm antes da ovulação (Ireland, 1987). São necessários 2 ciclos estrais para um folículo crescer do início da formação do antro (0,13 mm) ao tamanho pré-ovulatório (Lussier et al., 1987).

Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e teca externa; Gordon, 1994). Caracterizam-se pela presença de numerosas microvilosidades dentro da zona pelúcida, bem como de numerosas partículas lipídicas e mitocôndrias arredondadas e alongadas. Um maior

número de complexos de Golgi pode ser observado e os grânulos da cortical estão distribuídos no ooplasma, podendo-se evidenciar ainda os microtúbulos (Fair et al., 1997).

Os folículos maduros representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular. Neles predominam mitocôndrias arredondadas, mas mitocôndrias encapuzadas, que caracterizam o completo crescimento do oócito em bovinos, também são comumente encontradas. Retículos endoplasmáticos lisos e rugosos são observados em grande quantidade. Podem ser identificados ainda grânulos da cortical e microtúbulos no ooplasma do oócito. O espaço perivitelino é formado neste estágio de desenvolvimento e há um aumento no número de vesículas e de complexos de Golgi. É também no final deste estágio que a função do nucléolo é inativada, como indica a marginalização dos centros fibrilares, sinalizando uma presumível retração dos genes rRNA do nucléolo. Concomitantemente, a atividade transcricional do oócito é diminuída. Foi demonstrado, entretanto, que a transcrição de mRNA não é completamente inativada com o crescimento total do oócito (Hyttel et al., 1997).

Figura 3 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. A. Folículo Primordial; B. Folículo Primário; C. Folículo Secundário e D. Folículo Terciário; E. Folículo Pré-ovulatório. 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.



Fonte: (Adaptado de Rodgers et al., 1999).

2.4 ATRESIA FOLICULAR

Conforme exposto anteriormente, uma fêmea bovina nasce com aproximadamente 235.000 folículos por ovário, porém 99% desses folículos não chega a ovular, estes são eliminados por um processo conhecido por atresia folicular. A atresia pode ocorrer em qualquer momento do desenvolvimento folicular (Junqueira; Carneiro, 2004), mas

não é igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento (Fortune, 1994). Apesar de ser um fenômeno natural a atresia "regula", podemos assim dizer, o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (Figueiredo et al., 2002).

A atresia mais comum em folículos pré-antrais são alterações degenerativas que ocorrem no oócito. As mais observadas em folículos antrais, são alterações que ocorrem nas células da granulosa (Erickson, 1986). O processo de atresia folicular é fisiológico, de duração desconhecida e pode acontecer por via degenerativa ou por apoptose.

O processo de apoptose é tipicamente observado pela condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. O DNA sofre quebra entre as unidades de nucleossomos (Tilly, 1996); no citoplasma, as organelas citoplasmáticas sofrem agregação e desorientação e, ao mesmo tempo a membrana plasmática se retrai. Por fim a célula se rompe em diversos fragmentos conhecidos por corpos apoptóticos (Tilly, 1996). Esses corpos são então fagocitados. Posteriormente, fibroblastos ocupam a área de folículo e produzem uma cicatriz de colágeno que pode persistir por muito tempo (Junqueira; Carneiro, 2004).

2.5 FISILOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS

Diferenças reprodutivas entre animais taurinos e zebuínos têm estimulado pesquisas para identificar suas razões. Essa curiosidade muitas vezes é motivada por razões econômicas devido à grande variação de eventos reprodutivos em fêmeas de animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. O conhecimento dessas particularidades é fundamental para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos (Baruselli et al., 2007).

Muitas diferenças básicas são encontradas entre essas raças. Com relação ao comportamento do estro, fêmeas *Bos indicus* geralmente apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas), o que dificulta sua detecção (Bó et al., 2003). Além disso, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de estro no período noturno (Pinheiro et al., 1998; Membrive, 2000), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (Pinheiro et al., 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de estro. A duração do estro em *Bos indicus* é menor do que em *Bos taurus* (12,9 ± 2,9 horas em Nelore vs. 16,3 ± 4,8 horas em Angus; Mizuta, 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresenta diferenças entre estas duas raças (Nelore, 27,1 ± 3,3 horas vs. Angus, 26,1 ± 6,3 horas).

Nos processos de aspiração folicular em animais da raça Nelore, em média, são recuperados 18-25 oócitos (Pontes et al., 2011; Thibier, 2004; Watanabe et al., 1999) enquanto para raças taurinas a média é variável entre 4-14 oócitos (Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins Jr et al., 2007). Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (Boni et al., 1997).

Em média, animais *Bos indicus* têm mais ondas foliculares (Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000) que fêmeas *Bos taurus* bem como um número maior de folículos com diâmetro maior que 5mm (Segerson et al., 1984). O número de folículos menores é outra razão pela qual mais oócitos são obtidos de fêmeas zebuínas (Pontes et al., 2011) já que existe uma maior eficiência de oócitos recuperados de folículos menores que 4mm de diâmetro (Seneda et al., 2001). Uma hipótese para explicar o maior número de folículos recuperados de fêmeas zebuínas foi de que a reserva de folículos pré-antrais poderia ser maior nessas fêmeas. Porém, Silva-Santos et al. (2011) verificaram que essa diferença não é significativa, apesar de haver grande variação individual no número de folículos pré-antrais nas duas raças.

Outra característica reprodutiva é com relação ao nível de LH em fêmeas *Bos indicus* que exibem padrões únicos de metabolismo hormonal (Carvalho et al., 2008). No entanto fisiologicamente isso não está bem estabelecido.

Durante as ondas de crescimento folicular o diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante difere entre fêmeas *Bos taurus* (Ginther et al., 1989) e *Bos indicus* (Figueiredo et al., 1997). O diâmetro do corpo lúteo também parece ser menor em *Bos indicus* (Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997) do que em *Bos taurus* (Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990). Da mesma maneira, há relatos de que a concentração de progesterona produzida pelo CL é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (Segerson et al., 1984).

Essas diferenças se tornam importantes para que possam ser sistematizadas e então utilizadas de maneira racional para um melhor aproveitamento zootécnico desses animais.

3 HIPÓTESE

Existe correlação positiva entre o número de folículos antrais e o número de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas bovinas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a população folicular ovariana antral e pré-antral entre fêmeas *Bos taurus indicus* e 1/2 *Bos taurus taurus* X 1/2 *Bos taurus indicus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a população de folículos antrais de fêmeas Nelore (*indicus*) e Aberdeen Angus X Nelore (*taurus-indicus*) por ultrassonografia;
- Quantificar a população de folículos pré-antrais ovarianos em fêmeas *indicus* e *taurus-indicus* por histologia clássica;
- Comparar a população folicular antral e pré-antral entre fêmeas *indicus* e *taurus-indicus* de alta e baixa contagem de folículos antrais.

REFERÊNCIAS

- BARUSELLI, P.S., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205-211, 2007.
- BECKERS, J.F., DRION, P.V., FIGUEIREDO, J.R., GOFFIN, L., PIROTTIN, D., ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P., KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.
- BONI, R., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C., KOGUT, J., KRUIP THAM. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.
- BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.
- BURNS, D.S., JIMENEZ-KRASSEL, F.J., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., IRELAND J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.54-62. 2005.
- BUTLER, H.W. Ultrastructural studies on mitochondrial swelling. **Journal of Biochemistry**, v.118, p.883-886, 1970.
- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.27-36, 1979.
- CAIXETA, E.S., DODE, M.A.N., Veterinária e Zootecnia UNESP, v.17, p.8-18. 2010.
- CARROL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J., et al. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.321-327, 1990.
- CARVALHO, J.B.P., CARVALHO, N.A.T., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966a.

ERICKSON, B.H. Development and radio response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.97-105, 1966b.

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

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinology**, v.4, p.233-254, 1986.

FAIR, T., HULSHOF, C.J., HYTTTEL, P., GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**, v.195, p.327-336, 1997.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1^oed. São Paulo: Varela, 2002. p.227-234, 340.

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

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

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 135163, 2003.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S. et al. Mutations in an oocytes derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, p.279-283, 2000.

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

GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

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

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

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.573. 1995.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. p.573. 2004.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16(2), p.78-80, 1994.

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

IRELAND, J.J.. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.39-54, 1987.

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

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**. 10° ed. São Paulo: Guanabara Koogan. p.433-436, 2004.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**. 11° ed. São Paulo: Guanabara Koogan. p.431-438, 2008.

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

LUCCI, C.M., SILVA, R.V., CARVALHO, C.A., FIGUEIREDO, R., BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.41, p.61-69, 2001.

LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates follicles in the ovary of the cow. **Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.

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

MCNATTY, K. P., FIDLER, J.L., QUIRKE, L.D., SMITH, P.R., HEATH, D.A., LUNDY, T., O'CONNELL, A., TISDALL, D.J. **Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function**. *Molecular and cellular endocrinology*, v.163(1-2), p.11-20. 2000.

MARTINS, J.R., A., TAKADA, L., ABRAHÃO, R.G., FREITAS, C.P., CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).

MEMBRIVE, C.M.B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos indicus x Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17b estradiol + progesterona**. São Paulo, 2000. 156p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. São Paulo, 2003. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4262-71, 1999.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2a or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PONTES, J.H.F., SILVA, K.C.F., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P.H.S., FAIFER, F.S., STERZA, F.A.M., SCHENK, J.L., SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1359-1355. 2010.

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

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

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., NONATO JR., ERENO JR, J.C., PANSARD, H., SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Resumo).

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

SANTOS, R.G., SOTO, M.A.B., LOURENÇO, R.X., STRANIERI, P., BISHOP, W., ACCORSI, M.F., WATANABE, M.R., DAYAN, A., WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, p.79, 2005 (Resumo).

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

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

- SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., OLIVEIRA, J.A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43. 2001.
- SENEDA, M.M., SILOTO, L.S., MOROTTI, F., SCHNEIDER, C.L. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. In: 4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, v.4, p.14-22. 2010.
- SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057. 2011.
- SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the FecB gene. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.41-54, 1994.
- SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160. 2005.
- TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777-782. 2001.
- THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-19, 2004.
- TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.162-172, 1996.
- VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.
- VAN DEN HURK R., ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717- 1751. 2005.
- VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.
- WATANABE, M.R., WATANABE, Y.F., FRANCESCHINI, P.H., DAYAN, A., LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.438, 1999.
- WANDJI, S.A., EPPIG, J.J., FORTUNE, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vivo* of granulose cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817-832, 1996a.
- WANDJI, S.A., SRSENM V., BOSS, A.K., et al.. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996b.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

"COMPARAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA ANTRAL E PRÉ-ANTRAL DE FÊMEAS NELORE (*INDICUS*) E ½ NELOREXANGUS (*INDICUS-TAURUS*) "

RESUMO: O objetivo do trabalho foi comparar a população folicular ovariana antral e pré-antral de vacas Nelore (*indicus*) e % Nelore X Angus (*indicus-taurus*) de alta e baixa contagem de folículos antrais. Fêmeas (72-96m) *indicus* (n=20) e *indicus-taurus* (n=20) foram submetidas à aspiração folicular em dia aleatório do ciclo estral (D0), a fim de promover a ablação de todos os folículos >3mm e o início de nova onda de crescimento folicular. Os ovários foram avaliados por ultrassonografia (Áquila PRO, Pie medical, Maastricht, The Netherlands) usando transdutor microconvexo (7,5MHz) em D4, 19, 34, 49 e 64, para contagem de folículos antrais (CFA) >3mm. Após as avaliações, os animais foram separados em grupos de alta CFA (média >30 folículos; *indicus*, n=7 e *indicus-taurus*, n=6) e baixa CFA (<15 folículos; *indicus*, n=6 e *indicus-taurus*, n=6). Procedeu-se abate dos animais após D64. Os ovários foram obtidos para histologia e seccionados seriadamente a 7um. Uma a cada 120 secções foi montada em lâmina e corada em Ácido Periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. Os folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) foram quantificados usando fator de correção (Gougeon e Chainy, 1987. J Reprod Fertil, 81:433-442). Somente um ovário de cada animal foi avaliado. Buscou-se correlacionar a média de folículos antrais com a quantidade de folículos pré-antrais. Os dados foram analisados pelo teste de MannWhitney (P<0,05) e a correlação, pelo teste de regressão polinomial cúbica. Houve padrão de repetibilidade no número de folículos antrais por indivíduo durante as avaliações para os grupos de alta e baixa CFA. A média de folículos antrais (média±DP) foi 35±9 (*indicus*) e 38±6 folículos (*indicus-taurus*) para fêmeas de alta CFA, e 10±3 (*indicus*) e 12±2 folículos (*indicus-taurus*) para as de baixa CFA. Houve grande variação na quantidade de folículos pré-antrais entre indivíduos do mesmo grupo e entre as raças. O número médio de folículos pré-antrais nos ovários de *indicus-taurus* de alta CFA (116226±83156 folículos) foi maior (P<0,05) comparado a *indicus* de alta CFA (63032±58705 folículos). Entretanto, não houve diferença (P>0,05) entre *indicus* (28324±24525 folículos pré-antrais) e *indicus-taurus* (85748±129628 folículos) de baixa CFA. A média de folículos pré-antrais em *indicus* de alta CFA não diferiu (P>0,05) de *indicus-taurus* de baixa CFA. Não houve correlação entre folículos antrais e pré-antrais. Conclui-se que o grau de sangue *indicus* e a raça taurina utilizada podem ter contribuído para as diferenças encontradas entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de Nelore e % NeloreXAngus.

Palavras-chave: Foliculogênese. Estimativa folicular. Bovino. Nelore. Angus.

ABSTRACT: The aim of the present study was to compare the population of antral and preantral follicles in Nelore (*indicus*) and V2 NeloreXAngus (*indicus-taurus*) of high and low follicular count. *Indicus* (n=20) and *indicus-taurus* (n=20) females (72-90 mo old) were subjected to follicular aspiration randomly during their estrous cycle (D0) to withdraw all follicles >3mm and to induce the growth of a new follicular wave. Ovaries were examined by ultrasonography (Áquila PRO, Pie medical, Maastricht, The Netherlands) using a 7.5-convex array transducer, during days 4, 19, 34, 49 and 64, and antral follicles >3mm were counted. After these evaluations cows were assigned to two groups: high antral follicular counting

(AFC, mean >30 follicles; *Bos indicus*, n=7 and *Bos indicus*X*Bos taurus*, n=6) and low AFC (< 15 antral follicles; *Bos indicus*, n=6 and *Bos indicus*X*Bos taurus*, n=6). After D64, ovaries were collected at abattoir, processed for histology and serially sectioned at 7 μ m. One at every 120 sections was mounted and stained with periodic acid Schiff (PAS) and hematoxylin. The number of preantral follicles (primordial, primary and secondary) was estimated using a correction factor (Gougeon e Chainy, 1987. J Reprod Fertil, 81:433-442). Only one ovary per female was analyzed. There was an attempted to correlate the number of antral follicles with the population of preantral ones. Data was compared using the Mann-Whitney test (P<0.05) and correlation analyzed using cubic polynomial regression. There was a repeatability in the numbers of antral follicles during follicular waves per individual of high and low AFC. The mean number of antral follicles (mean \pm SD) was 35 \pm 9 (*indicus*) and 38 \pm 6 follicles (*indicus-taurus*) for the high AFC group, and 10 \pm 3 (*indicus*) and 12 \pm 2 follicles (*indicus-taurus*) for the low AFC. A large variation in numbers of preantral follicles was observed among individuals within the same group and between breeds. The mean number of preantral follicles in *indicus-taurus* of high AFC (116,226 \pm 83,156 follicles) was greater (P<0.05) compared to *indicus* (63,032 \pm 58,705 follicles). However, there was no difference (P>0.05) between the average number of preantral follicles of *indicus* (28,324 \pm 24,525 follicles) and *indicus-taurus* (85,748 \pm 129,628 follicles) of low AFC. The average number of preantral follicles from *indicus* of high AFC did not differ (P>0.05) from that of *indicus-taurus* of low AFC. There was no correlation between antral and preantral follicles. We conclude that both the influence of *indicus* cattle and the *taurus* breed may contributed for differences between Nelore and 1/2 NeloreXAngus in numbers of antral and preantral follicles.

Keywords: Folliculogenesis. Follicular estimate. Bovine. Nelore. Angus.

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo 80% composto por animais zebuínos (Pontes et al., 2010), com destaque para a raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Essa raça ainda se destaca por apresentar uma alta taxa de recuperação oocitária em procedimentos de aspiração folicular guiadas por ultrassom (OPU) comparado a animais das raças européias. Essa particularidade do rebanho brasileiro, faz com que o Brasil seja um dos líderes mundiais na produção *in vitro* de embriões (Thibier, 2007).

Para melhor aproveitamento do potencial reprodutivo do rebanho, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido amplamente utilizada. Em seções de OPU, foram recuperados em média 18-25 oócitos (Pontes et al., 2011; Thibier et al., 2004; Watanabe et al., 1999) em raças zebuínas, enquanto para raças taurinas a média é de 4-14 oócitos (Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins Jr et al., 2007). Em animais cruzados *indicus-taurus*, a recuperação oocitária diferiu entre animais VV Holandês X % Gir e Vá Holandês X Gir (20,4 vs. 31,4 oócitos; Pontes et al., 2010). Já foi demonstrado que quanto maior o grau de sangue *Bos indicus*, maior a obtenção de oócitos *in vivo* (Rubin et al., 2005).

Uma possível explicação para a diferença existente entre as taxas de recuperação de oócitos em animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* através da OPU seria a população de folículos pré-antrais. Apesar dos trabalhos sugerindo a presença de células germinativas em ovários de fêmeas adultas (Johnson et al., 2004; Zou et al., 2009), ainda é bem estabelecido que os folículos pré-antrais, formados no estágio fetal das fêmeas, constituem a reserva folicular ovariana que será utilizada durante toda a vida reprodutiva da fêmea, sendo responsável pela formação dos folículos antrais. Porém, não foram descritas diferenças em relação à quantidade de folículos pré-antrais entre animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Silva-Santos et al., 2011).

Foi relatada uma alta variabilidade na população folicular ovariana pré-antral (Erickson, 1966 a,b; Silva-Santos et al., 2011), entretanto, não existem relatos sobre a influência dessa variação individual no número de folículos pré-antrais sobre a quantidade de folículos antrais recrutados durante o ciclo estral. Em relação a folículos antrais, já foi relatado padrão de repetibilidade na quantidade destes folículos por onda de crescimento folicular (Burns et al., 2005). Contudo, não existem trabalhos comparando a população folicular pré-antral e antral.

Neste contexto, a comparação entre a população folicular pré-antral e antral entre fêmeas *indicus* e *taurus* que apresentam alta e baixa quantidade de folículos ovarianos antrais teria grande importância para a compreensão das diferentes taxas de recuperação oocitária obtidas na aspiração folicular. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo correlacionar o número de folículos antrais com a população folicular pré-antral ovariana de vacas *Bos taurus indicus (indicus)* e VV *Bos taurus indicus x Bos taurus taurus (indicus-taurus)* de alta e baixa contagem de folículos antrais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Vacas *indicus* (Nelore, n=20, 72-96 meses) e *indicus-taurus* (Nelore x Angus, n=20, 72-96 meses) não gestantes, saudáveis, ciclando e com escore de condição corporal 3-3,5 (escala de 1-5) foram submetidas à aspiração folicular em dia aleatório do ciclo estral (D0), a fim de promover a ablação de todos os folículos >3mm e o início de uma nova onda de crescimento folicular.

Em D4, D19, D34, D49 e D64 as vacas foram submetidas a avaliações ultrassonográficas (Áquila PRO, Pie medical, Maastricht, The Netherlands) com transdutor microconvexo via endovaginal (7,5 MHz) para contagem de folículos antrais >3mm (CFA). Após as cinco avaliações, as vacas foram divididas em dois grupos: alta CFA (média de folículos >30; *Bos taurus indicus*, n=7 e V2 *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*, n=6) e baixa CFA (<15 folículos; *Bos taurus indicus*, n=6 e V2 *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*, n=6).

Depois da última avaliação (D64), as fêmeas foram levadas ao abate para obtenção dos ovários e posterior processamento histológico.

5.2.2 Processamento Histológico

Após a obtenção dos ovários, os mesmos foram lavados em solução salina 0,9%, seccionados longitudinalmente em duas metades e imersos em fixador Bouin para processamento histológico. Os hemi-ovários foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e cortados seriadamente a intervalos de 7 um de espessura em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar - Alemanha). Cada 120° secção (Cahill et al., 1979) foi montada em lâmina histológica e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina, para análise estrutural do ovário e dos folículos ovarianos. Apenas um ovário de cada fêmea foi analisado.

5.2.3 Folículos Ovarianos

Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em: primordiais (uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso envolvendo o oócito), primários (uma camada de células da granulosa de formato cúbico envolvendo o oócito) ou secundários (oócitos envolvidos por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico) (Hulshof et al., 1994). A morfologia folicular foi avaliada em microscópio de luz (Nikon®, Tóquio - Japão), considerando-se a integridade da membrana basal, a densidade celular, a presença ou ausência de corpos picnóticos e a integridade do oócito. Baseado nesses parâmetros, somente folículos saudáveis foram avaliados (Lucci et al., 2002).

Com o auxílio de uma ocular micrométrica, o diâmetro médio do oócito foi determinado utilizando-se dois folículos de cada categoria em cada secção avaliada. A

estratégia de se considerar o oócito serviu para evitar a contagem do mesmo folículo em duas seções. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo operador.

5.2.4 Estimativa Folicular

O número de folículos pré-antrais foi estimado pela contagem de todos os folículos em cada secção. Para que um mesmo folículo não fosse contado duas vezes na mesma seção, fez-se uma marcação com caneta na borda da seção histológica. A contagem era iniciada a partir deste ponto, em sentido horário, até que toda a cortical fosse avaliada. somente folículos com o núcleo do oócito visível foram contados. O núcleo do oócito foi utilizado como marcador, de acordo com fator de correção descrito por Gougeon e Chainy (1987) e a fórmula:

$$Nt = \frac{No \times St \times ts}{so \times do}$$

Sendo:

Nt = Número total calculado de um tipo de folículo;

No = Número de um tipo de folículo observado no ovário;

St = Número total de cortes feitos no ovário;

ts = Espessura do corte;

So = Número total de cortes observados;

do = Diâmetro médio do núcleo de cada tipo de folículo

5.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados pela média \pm DP. O software Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007) foi utilizado para teste de normalidade da amostra, e verificou-se que não houve normalidade. Dessa forma, o teste Mann-Whitney foi utilizado e as variáveis analisadas duas a duas. o teste de correlação utilizado foi a regressão polinomial cúbica. A significância foi estabelecida com $P < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

No acompanhamento de 25 vacas, durante cinco avaliações, houve repetibilidade no número de folículos antrais para todas as fêmeas avaliadas. O número médio de folículos antrais presentes nos ovários de vacas *indicus* de alta CFA foi 35 ± 9 e, para as de baixa CFA, 10 ± 3 . Para animais *indicus-taurus* de alta, a média foi 38 ± 6 e, para as de baixa CFA, 12 ± 2 (Tabela 1).

Tabela 1 –Número médio (média \pm DP) de folículos antrais por ovário de vacas *Bos taurus indicus* e V2 *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* de alta e baixa Contagem Folicular Antral (CFA), avaliadas por ultrassonografia.

Grupos	No. folículos antrais por ovário					Média
	US 1	US 2	US 3	Us 4	US 5	
<i>indicus</i> alta (n = 7)	32 ± 8^a	36 ± 9^a	37 ± 12^a	37 ± 12^a	34 ± 9^a	35 ± 9^a
<i>indicus</i> baixa (n = 6)	10 ± 3^b	9 ± 4^b	9 ± 4^b	11 ± 3^b	11 ± 4^b	10 ± 3^b
<i>indicus - taurus</i> alta (n = 6)	35 ± 10^a	38 ± 8^a	37 ± 8^a	41 ± 11^a	38 ± 6^a	38 ± 6^a
<i>indicus - taurus</i> baixa (n = 6)	12 ± 4^b	12 ± 3^b	11 ± 2^b	13 ± 3^b	12 ± 2^b	12 ± 2^b

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0.05).

Foram avaliadas 253 seções histológicas a partir dos 25 ovários recuperados; em média 112 folículos pré-antrais foram contados por seção. O número médio de folículos pré-antrais por ovário de fêmeas *indicus* e *indicus-taurus* de alta e baixa CFA foi semelhante. Obteve-se média de $63\,032 \pm 58\,705$ (média \pm DP) folículos pré-antrais de animais *indicus* de alta CFA, $28\,324 \pm 24\,525$ de *indicus* de baixa CFA, $116\,226 \pm 83\,156$ de *indicus-taurus* de alta CFA e $85\,748 \pm 129\,628$ de *indicus-taurus* de baixa CFA (Tabela 2).

Fêmeas *indicus* de alta CFA apresentaram variação de folículos pré-antrais entre 10 719 e 152 999 folículos, *indicus-taurus* 51 302 a 260 751 folículos; fêmeas *indicus* de baixa CFA entre 1 754 a 62 348 folículos e *indicus-taurus* 2 909 a 320 504 folículos. Houve diferença significativa na quantidade de folículos pré-antrais de vacas *indicus* e *indicus-taurus* de alta CFA e entre *indicus* de baixa CFA e *indicus-taurus* de alta CFA.

Houve diferença significativa entre o número médio de folículos pré-antrais primordiais de vacas *indicus* e *indicus-taurus* de alta CFA (P=0,03) e entre *indicus* e *indicus-*

taurus de baixa CFA (P=0,04). Em folículos pré-antrais primários, houve diferença entre fêmeas *indicus* e *indicus-taurus* de alta CFA (P=0,04) e entre *indicus* de alta CFA e *indicus-taurus* de baixa CFA (P=0,0076). Em relação a folículos pré-antrais secundários, houve diferença entre vacas *indicus* e *indicus-taurus* do grupo alta CFA (P=0,0033); *indicus* e *indicus-taurus* de baixa CFA (P=0,02), e entre *indicus* de alta CFA e *indicus-taurus* de baixa CFA (P=0,0013), e *indicus* de baixa CFA e *indicus-taurus* de alta CFA (P=0,03).

Tabela 2 – Média (\pm DP) de folículos pré-antrais de vacas *Bos taurus indicus* e $\frac{1}{2}$ *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* de alta e baixa CFA.

Grupos	Pré-antrais			
	Primordial	Primário	Secundário	Total
<i>indicus</i> alta CFA (n = 7)	43623 \pm 39136 ^b	21017 \pm 17964 ^a	4283 \pm 4681 ^a	63032 \pm 58705 ^b
<i>indicus</i> baixa CFA (n = 6)	10282 \pm 14393 ^c	8219 \pm 7912 ^{ab}	9822 \pm 11199 ^a	28324 \pm 24525 ^b
<i>indicus - taurus</i> alta CFA (n = 6)	109370 \pm 80192 ^a	6279 \pm 3661 ^b	577 \pm 538 ^b	116226 \pm 83156 ^a
<i>indicus - taurus</i> baixa CFA (n = 6)	81561 \pm 128402 ^{ab}	3995 \pm 3074 ^b	149 \pm 49 ^b	85748 \pm 129628 ^{ab}

a-c Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0.05).

Não houve correlação entre a população folicular antral e pré-antral entre as fêmeas avaliadas. No grupo de *indicus* de alta CFA, n=5 fêmeas obtiveram número de folículos pré-antrais menor (10 719, 16 585, 27 690, 49 519 e 55 752 folículos) que a média (63 032 folículos) do grupo. No grupo de *indicus-taurus* de alta CFA, n=4 fêmeas obtiveram número de folículos pré-antrais menor (57 596, 51 302, 70 503 e 85 954 folículos) que a média (116 226 folículos) do grupo. No grupo de *indicus* de baixa CFA, n=3 obtiveram número de folículos pré-antrais maior (30 975, 38 828 e 62 348 folículos) que a média (24 265 folículos) do grupo. No grupo de *indicus-taurus* de baixa CFA, n=2 fêmeas obtiveram número de folículos pré-antrais maior (99 696 e 320 504 folículos) que a média (85 748 folículos) do grupo.

Entre os ovários avaliados (n=25), 18 (72%) apresentaram folículos multioócitos (primordial, primário e secundário). Foram encontrados folículos multioócitos em vacas *indicus* (n=5) e *indicus-taurus* (n=6) de alta CFA e em *indicus* (n=4) e *indicus-taurus* de baixa CFA (n=3).

5.4 DISCUSSÃO

Após cinco avaliações sucessivas por ultrassonografia, fêmeas *indicus* e *indicus-taurus* de alta e baixa CFA apresentaram repetibilidade no número de folículos antrais. A repetibilidade no número de folículos antrais por onda de crescimento folicular já foi relatada em bovinos leiteiros (Burns et al., 2005). Isso permitiu a separação dos grupos de maneira confiável.

O número médio de folículos antrais dos animais *indicus* (10 ± 3) e *indicus-taurus* de baixa CFA (12 ± 2) foi semelhante ao número médio relatado em estudo anterior para fêmeas *taurus* de baixa CFA ($10\pm 1,1$; Ireland et al., 2009). O número médio de folículos antrais de animais *indicus* (35 ± 9) e *indicus-taurus* de alta CFA (38 ± 6) foi maior comparado a estudo anterior com animais *taurus* ($27\pm 1,2$; Ireland et al., 2009).

No presente trabalho, não foi observada diferença significativa em relação à quantidade média de folículos antrais entre fêmeas *indicus* (35 ± 9) e *indicus-taurus* (38 ± 6) de alta CFA e entre *indicus* (10 ± 3) e *indicus-taurus* (12 ± 2) de baixa CFA. Entretanto, houve diferença entre os grupos de alta e baixa CFA para fêmeas da mesma raça. Desta forma, considerando-se fêmeas do mesmo grupo, sugere-se taxa de recrutamento semelhante para animais do grupo de alta CFA e também para os de baixa CFA.

No entanto, fêmeas *indicus* apresentam mais ondas foliculares (viana et al., 2000), maior quantidade de folículos por onda de crescimento folicular (Carvalho et al., 2008) e maior quantidade de oócitos recuperados por sessão de aspiração folicular (média 3 a 4 vezes maior; Rubin et al., 2005; Martins Jr et al., 2007), comparado a fêmeas *taurus*. Associado a estas diferenças entre *indicus* e *taurus*, já foi estabelecido que fêmeas bovinas que apresentam baixa CFA durante as ondas de crescimento folicular também apresentam menor concentração de FSH circulante. Além disso, a expressão de genes ligados à produção de estradiol pelas células da granulosa (CYP19A1), regulação da ação do FSH, diferenciação de função das células da teca (TBC1D1), capacidade de resposta do estradiol (ESR1, ESR2) e determinantes da capacidade oocitária em células do cumulus (CTSB) pode estar associada à alta variação do número de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular (Ireland et al., 2009). Alta variação esta, que não foi observada em nosso trabalho e que poderia estar relacionado então com a expressão desses genes.

Também já foi demonstrado que a variação no número de oócitos obtidos por OPU está relacionada com a expressão de genes GDF9, BMP15, e FGF8 (Biase et al.,

2008). Entretanto, ainda não há relatos sobre o impacto das diferenças entre fêmeas de alta e baixa CFA na competência oocitária e na fertilidade destas fêmeas.

Em estudo com animais cruzados *indicus* X *taurus*, a taxa de recuperação oocitária variou entre animais Gir (17,1±4,5 oócitos), Holandês (11,4±3,9 oócitos), Vi Holandês X % Gir (20,4±5,8 oócitos) e V Holandês X Gir (31,4±5,6 oócitos; Pontes et al., 2010); e já foi demonstrado que quanto maior o grau de sangue *Bos indicus*, maior a obtenção de oócitos *in vivo* (Rubin et al., 2005). Provavelmente, o grau de sangue *indicus* e também a raça *taurus* dos animais cruzados utilizados no presente trabalho influenciaram na quantidade de folículos antrais ovarianos.

Em relação a folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), houve variação na quantidade destes folículos em vacas *indicus* e *indicus-taurus*, entre animais do mesmo grupo e entre as raças, semelhante ao que já foi descrito em trabalhos anteriores (Tanaka et al., 2001; Silva-Santos et al., 2011), com relatos de variação entre 0 e 700 000 folículos pré-antrais (Erickson, 1966).

Silva-Santos et al. (2011) não observaram diferenças na quantidade de FOPA quando compararam fêmeas *indicus* e *taurus* de diferentes idades e sugeriram haver diferenças nas taxas de atresia folicular entre as raças. No entanto, no presente trabalho, observamos diferenças significativas entre as raças e os grupos de alta CFA (*indicus* e *indicus-taurus*), e alta (*indicus-taurus*) e baixa CFA (*indicus*); sendo a média de folículos pré-antrais de fêmeas *indicus-taurus* do grupo de alta CFA (116 226 folículos) maior que a de fêmeas *indicus* do grupo de alta CFA (63 032 folículos). Embora não existam outros estudos comparando a população folicular entre raças, o número médio de folículos pré-antrais relatado para novilhas Angus (109 613 folículos; Silva-Santos et al., 2011) foi menor comparado a novilhas Hereford (132 000 folículos; Erickson, 1966 a). Já para vacas, a média de animais Angus (89 577 folículos; Silva-Santos et al., 2011) foi superior a de animais Hereford (22 000 folículos; Erickson, 1966 a). Portanto, podemos supor que o grau de sangue *indicus* e as raças taurinas envolvidas nos cruzamentos possam influenciar na quantidade de FOPA.

Folículos multioócitos foram encontrados em animais *indicus* e *indicus-taurus* nos dois grupos avaliados. De 25 ovários avaliados, 18 (72%) apresentaram folículos multioócitos. Essas estruturas já foram descritas em vacas na proporção de 83% (Lucci et al., 2002) e 45% (Silva-Santos et al., 2011), em fetos bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus* no primeiro trimestre de gestação (Diniz et al., 2005; Silva-Santos et al., 2011), e em novilhas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Silva-Santos et al., 2011) até o estágio de folículo

antral (Ireland et al., 2008). Entretanto, não existem informações se existe influência destes folículos na foliculogênese, afetando a quantidade de FOPA (Silva-Santos et al., 2011).

Não houve correlação entre o número de folículos antrais e pré-antrais entre as fêmeas. Apesar de pertencerem ao grupo de alta CFA, mais que a metade dos animais avaliados (*indicus* n=5/7, *indicus-taurus* n=4/6) obtiveram número de folículos pré-antrais abaixo da média do grupo. Em fêmeas *indicus-taurus* do grupo de baixa CFA, dois animais obtiveram número de folículos pré-antrais acima da média do grupo, sendo que um obteve número de folículos maior (320 504 folículos) que a média dos grupos de alta CFA (*indicus*, média=63 032 folículos; *indicus-taurus*, média=116 226 folículos).

Com este trabalho, concluímos que fêmeas *indicus* e *indicus-taurus* de alta CFA e baixa CFA, apresentam repetibilidade no número de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular. Fêmeas *indicus-taurus* de alta CFA apresentaram maior quantidade de folículos pré-antrais comparado a fêmeas *indicus* de alta CFA. Provavelmente, o grau de sangue *indicus* e a raça taurina utilizada tenham contribuído para esta diferença. E não houve correlação entre a quantidade de folículos antrais e pré-antrais entre os animais.

5.5 REFERÊNCIAS

- AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 5.0. Statistical applications in biological and medical sciences. Sociedade Civil Mimirauá, Brasília, CNPq, 138 pp, 2007.
- BURNS, D.S., JIMENEZ-KRASSEL, F.J., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., IRELAND J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.54-62. 2005.
- BIASE, F.H., FONSECA, M.G.K., FREITAS, S.B.W.K., MARTELLI, L., MEIRELLES, F.V. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. **Zygote**, v.16, n.1, p.29-38, 2008.
- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.27-36, 1979.
- CARVALHO, J.B.P., CARVALHO, N.A.T., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008.
- DINIZ, E.G., ESPER, C.R., JACOMINI, J.O., VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.70-76, 2005. ERICKSON, B.H. Development and

senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966a.

ERICKSON, B.H. Development and radio response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.97-105, 1966b.

GOUGEON, A., CHAINY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.433-442, 1987.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16(2), p.78-80, 1994.

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

IRELAND, J.J., ZIELAK-STECIWKO, A.E., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER J., BETTEGOWDA, A., SCHEETZ, D., WALSH, S., MOSSA, F., KNIGHT, P.G., SMITH, G.W., LONERGAN, P., EVANS A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954-964. 2009.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150. 2004.

LUCCI, C.M., RUMPF, R., FIGUEIREDO, J.R., BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57, p.1467-1483, 2002.

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

MARTINS, J.R., A., TAKADA, L., ABRAHAO, R.G., FREITAS, C.P., CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae** v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).

PONTES, J.H.F., SILVA, K.C.F., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P.H.S., FAIFER, F.S., STERZA, F.A.M., SCHENK, J.L., SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1359-1355. 2010.

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., NONATO JR., ERENO JR, J.C., PANSARD, H., SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Resumo).

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

TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777-782. 2001.

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

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

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

ZOU, K., YUAN, Z., YANG, Z., LUO, H., SUN, K., ZHOU, L., XIANG, J., SHI, L., YU, Q., ZHANG, Y., HOU, R., WU, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nat Cell Biology**, v.11, p.631-636. 2009.

CONCLUSÕES

Com este trabalho pudemos concluir que:

- Fêmeas *Bos taurus indicus* e V2 *Bos taurus indicus* x V2 *Bos taurus taurus* de alta CFA e baixa CFA, apresentam repetibilidade no número de folículos antrais durante as ondas de crescimento folicular;
- Fêmeas *taurus* de alta CFA apresentam maior quantidade de folículos pré-antrais em relação a fêmeas *indicus* de alta CFA
- Não existe correlação entre a quantidade de folículos antrais e pré-antrais entre os animais.