

ANTÔNIO GUILHERME RONCADA PUPULIM

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO  
ANTIMULLERIANO COM A POPULAÇÃO FOLICULAR E  
FERTILIDADE EM FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista -UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSANGELA APARECIDA LOBO*

Pupulin, Antônio Guilherme Roncada.

Relação da concentração do hormônio antimülleriano com a população folicular e fertilidade em fêmeas bovinas / Antônio Guilherme Roncada  
Pupulin- Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências de Botucatu

Orientador: *Ciro Moraes Barros*

Co-Orientador: *Bárbara Loureiro*

Capes: 21001006

1. Aberdeen-angus (Bovino). 2. Nelore (Zebu). 3. Bovino - Fecundidade.  
4. Hormônio folículo-estimulante. 5. Reprodução animal.

Palavras-chave: Aberdeen Angus; AMH; Nelore; fertilidade; folículos.

***DEDICATÓRIA***

## Dedico à

À Deus, a minha noiva Luciana, meus pais Antônio Roberto Pupulim e Sonia Maria Pupulim, minha irmã e cunhado Danielly Roncada Pupulim, Valdinei e aos meus sobrinhos João Gabriel e Lucas e aos meus avós, Antônio e Geralda Pupulim e Olgo e Luiza Roncada (*in memoriam*).

***AGRADECIMENTOS***

## Agradeço

Especialmente ao meu orientador, Professor Dr. Ciro Moraes Barros: exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar a resposta para minhas dúvidas;

À minha noiva Luciana. Agradeço por ser carinhosa em todos os momentos do meu trabalho;

A todos os meus familiares, principalmente a Pupulim, Soninha, Dany, João, Lucas e Dinei. Essa é mais uma de nossas vitórias;

À família Rabito Davantel: José Hélio, Lucelena, Paulo, Laninha, João Pedro Fernando, Lívia, Fernandinho, Maria Isabel, Gustavo e Natália. Considero-lhes minha família e agradeço pela torcida;

Aos meus amigos Eduardo, Ronaldo, Diego, Rafael, Isabele, Josmar, Carla, Pedro, Felipe, Fábio, Anthony, Marcelo, Lucacin, José Renato, Mariana, Maurício, Bárbara, Raquel, Walter, Bruno, Janahi, Patrícia, Vinícius, Leo e aos integrantes do laboratório do prof. Di Stasi: obrigado pelas conversas e boas risadas. Agradeço, especialmente, aos amigos Ronaldo, Bárbara, Mauricio, pelo auxílio no desenvolvimento do experimento.

Aos meus amigos Eduardo, Diego, Rafael e Ronaldo, amigos que dividi não somente a casa e/ou momento de alegria, mas também momentos difíceis ao longo dessa jornada e em momentos diferentes sempre me aconselharam. Grandes amigos.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos que me foram passados;

Ao meu amigo Ronaldo, que em todos os momentos de trabalho, viagens, estudos e discussões produtivas, sempre tentou me guiar para o melhor caminho;

À minha professora de graduação e amiga Isabele Picada Emanuelli, que sempre incentivou em meus estudos e conhecimento, abrindo portas para o mestrado;

Ao professor Josmar Mazucheli do Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Maringá pela realização das análises estatística deste trabalho. Obrigado pela paciência e disponibilidade prestada;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Ana Cristina, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni. Obrigado pela amizade;

À fazenda Cristal, por permitir que o experimento fosse realizado em sua propriedade

A CAPES e à FAPESP, pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

***EPÍGRAFE***



“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

***SUMÁRIO***

## Lista de abreviatura

CAPÍTULO 1	15
RESUMO	17
1-INTRODUÇÃO	22
2 – HIPÓTESES	26
3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 - REVISÃO DE LITERATURA	28
4.1 - Foliculogênese.....	28
4.2 - Dinâmica Folicular.....	29
4.3 - População folicular.....	31
4.4 - Hormônio Anti-Mulleriano.....	35
5 – REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2	46
RESUMO	48
Introdução	49
Material e Método	50
Experimento 1: .....	50
Experimento 2:.....	51
Experimento 3: .....	52
Coleta de sangue .....	54
Determinação da concentração plasmática de AMH.....	54
Análise estatística .....	54
RESULTADOS	55
Experimento 1:.....	55
Experimento 2:.....	57
Experimento 3:.....	58
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS	62



### **Lista de abreviatura**

**IATF** - Inseminação artificial em tempo fixo  
**TE** - Transferência de embrião  
**AMH** - Homônio antimulleriano  
**TGF $\beta$**  - Fator de crescimento tranformante do tipo beta  
**Mm** - Milímetro  
**PGF $_{2\alpha}$**  - Prostaglandina  
**EPM** - Erro padrão da média  
**Kg** - Quilograma  
**US** - Ultrassom  
**ACF** - Alta contagem folicular  
**ICF** - Intermediária contagem folicular  
**BCF** – Baixa contagem folicular  
**DIP** – Dispositivo intravaginal de progesterona  
**mg** – Miligrama  
**IM** – Intramuscular  
**UI** – Unidade Internacional  
**ml** – Mililitro  
 **$\mu$ g** – Micrograma  
**LH** – Hormônio luteinizante  
**LHr** – Receptor do Hormônio luteinizante  
**D0** – Dia zero  
**D5** – Dia cinco  
**D8** – Dia oito  
**FSH** – Hormônio folículo estimulante  
**FSHr** – Receptor do hormônio folículo estimulante  
**GDF9** – Fator de crescimento de diferenciação do tipo 9  
**BMP15** – Proteína morfogênica óssea do tipo 15  
**Kitl** – Kite ligand  
**ZP1** – Glicoproteína da zona pelúcida 1  
**ZP2** – Glicoproteína da zona pelúcida 2  
**ZP3** – Glicoproteína da zona pelúcida 3  
**EGF** – Fator de crescimento epidermal

**µm** – micrometro

**IGF** – Fator de crescimento semelhante à insulina

**STAR** – Steroidogenic acute regulatory

**IA** – Inseminação artificial

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**IGF1** - Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1

**P450** – Enzima mitocondrial do citocromo P 450

**AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina

**CE** – Ciclo estral

**bST** – Somatotropina bovina

**ng** – Nanograma

**vs** – versus

**OPU** – ovum pick up

**CS** – Coleta de Sangue

**RT-PCR** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

# CAPÍTULO 1

***RESUMO E ABSTRACT***

***INTRODUÇÃO***

***HIPÓTESE E OBJETIVOS***

***REVISÃO DE LITERATURA***

***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

***RESUMO E ABSTRACT***



## RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTIMÜLLERIANO COM A POPULAÇÃO FOLICULAR E FERTILIDADE EM FÊMEAS BOVINAS

### RESUMO

O crescimento folicular em bovinos ocorre em um padrão de ondas que pode variar de 2 a 3 por ciclo estral e caracteriza-se pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos antrais, onde apenas um se tornará dominante. A quantidade de folículos recrutados é variável entre os animais, porém apresenta alta repetibilidade entre os indivíduos. Animais *Bos indicus* apresentam maior quantidade de folículos recrutados por onda que animais *Bos taurus*. Objetivou-se com o presente trabalho, (1) identificar fêmeas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus*), que possuam elevado ou reduzido número de folículos recrutados por onda e relacionar o número de folículos à concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano (AMH); (2) relacionar o número de folículos antrais à fertilidade de fêmeas Nelore e; (3) determinar se o tratamento superestimulatório altera as concentrações plasmáticas de AMH em vacas Nelore. No experimento 1, contagem do número de folículos antrais das fêmeas Nelore (n=20) e Angus (n=30) foi feita por duas avaliações ultrassonográficas (US). Considerando a média  $\pm$  EPM da contagem de folículos antrais de cada raça, as novilhas foram classificadas em alta contagem folicular (ACF; n= 9 novilhas Nelore e 15 Angus) ou baixa contagem folicular (BCF; n= 11 novilhas Nelore e 15 Angus). O AMH foi mensurado por Elisa em uma amostra de sangue coletada durante a última US. No experimento 2, foram utilizadas novilhas da raça Nelore (n=86) submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). As novilhas foram classificadas (avaliação US no D0 da IATF) em 3 grupos: ACF (>40 folículos; n=29), intermediário (ICF; >20 e <40 folículos; n=34) e BCF (<20 folículos; n=23). No experimento 3, foram utilizadas 20 vacas da raça Nelore de ICF e ACF. Os animais foram separados pela contagem folicular e distribuídos em 2 grupos: Grupo controle IATF (n=9) e grupo P36 (superestimuladas com FSH; protocolo P36; n=11). As amostras de sangue para dosagem de AMH foram obtidas no D5 (P36) e no D8 (IATF e P36; fim do tratamento

superestimulatório). No experimento 1, os resultados foram analisados segundo o modelo de análise das variâncias. Para o experimento 2, foi utilizada análise de variância para determinação do número de folículos dentro de cada classificação (ACF, ICF e BCF). Para as comparações da concentração de AMH para o experimento 3 o teste t-student. Foi ajustado um modelo de regressão logística para determinar a influência do número de folículos na taxa de prenhez. No experimento 1 a contagem de folículos antrais foi maior ( $P < 0.05$ ) nas fêmeas Nelore ( $34.4 \pm 5.4$  folículos) em relação as fêmeas Angus ( $20 \pm 2.6$  folículos). A concentração plasmática de AMH nas fêmeas Nelore ( $0.4 \pm 0.21$  ng/ml) também foi maior ( $P < 0.01$ ) que nas fêmeas Angus ( $0.13 \pm 0.01$  ng/ml). A concentração plasmática de AMH nas fêmeas de ACF ( $59.66 \pm 3$  folículos;  $0.52 \pm 0.07$  ng/ml) diferiram ( $P < 0.04$ ) das fêmeas de BCF ( $13.7 \pm 1$  folículos;  $0.27 \pm 0.07$  ng/ml) na raça Nelore. Nas fêmeas Angus, houve uma tendência ( $P = 0.064$ ) da concentração de AMH ser maior nos animais de ACF ( $26.9 \pm 1.4$  e folículos;  $0.165 \pm 0.02$  ng/ml) em relação as fêmeas BCF ( $9.3 \pm 0.9$  folículos;  $0.11 \pm 0.02$  ng/ml). No experimento 2, a taxa de prenhez não diferiu entre os grupos ACF (39%), ICF (23%) e BCF(38%). As vacas submetidas ao protocolo de superestimulação ovariana no experimento 3 apresentaram maior ( $P < 0.001$ ) concentração de AMH no D8 ( $0.99 \pm 0.38$  ng/ml) quando comparada ao D5 ( $0.39 \pm 0.2$  ng/ml). Além disso, vacas não superestimuladas não sofreram alteração da concentração plasmática de AMH ao fim do protocolo de IATF (D8,  $0.33 \pm 0.15$  ng/ml) em relação ao D5 do protocolo P36. Conclui-se que: a) fêmeas Nelore possuem maior número de folículos em relação as Angus e que a população folicular esta relacionada aos níveis plasmáticos de AMH, b) a fertilidade não está correlacionada com o número de folículos antrais de novilhas Nelore, c) o tratamento superestimulatório aumenta as concentrações plasmáticas de AMH

Palavras-chave: Nelore, Angus, folículos, AMH e fertilidade.

## ABSTRACT

In bovines follicular development happens in a wave pattern that can vary from two to three waves per estral cycle with a group of follicles growing simultaneously but with only one becoming the dominant follicle. The number of recruited follicles is highly variable between animals; however, it is highly repeatable within an animal. *Bos indicus* animals present a greater number of follicles per wave than *Bos taurus* animals. The objective of the present study was 1) identify animals from the Nelore and Aberdeen Angus breed that have high or low number of follicles recruited per follicle wave and relate the number of follicles with AMH concentration; 2) to relate the number of antral follicles with the fertility of Nelore females; 3) to determine if the superstimulatory treatment alters the plasmatic concentrations of AMH. In experiment 1 the follicle count in Nelore and Angus heifers was done through two ultrasound examinations (US). Considering the mean  $\pm$  SEM of the follicle count in each breed, the heifers were grouped in high (HFC) or low (LFC) follicle count. Plasmatic AMH was measured in a blood sample drawn at the last US. In Experiment 2, there were used Nelore heifers submitted to a TFAI protocol. Heifers were grouped in HFC (>40 follicles), intermediary (>20 and <40 follicles) and LFC (<20 follicles). In experiment 3, Nelore cows with high and intermediary follicles counts were used. Animals were separated in control TFAI group and P36 group. Blood samples for AMH measurement were collected on day 5 (P36) and on day 8 (TFAI and P36). Results from experiment 1 were analyzed using ANOVA. Experiment 2 was analyzed using a logistic regression and experiment 3 was analyzed using t-student. In experiment 1, follicle count was higher ( $p < 0.005$ ) in Nelore heifers ( $34.4 \pm 5.4$  follicles) when compared with Angus heifers ( $20 \pm 2.6$ ). Plasmatic AMH concentration was higher ( $p < 0.04$ ) in HFC Nelore heifers ( $59.66 \pm 3$  follicles;  $0.52 \pm 0.07$  ng/ml) when compared to LFC Nelore heifers ( $13.7 \pm 1$  follicles;  $0.27 \pm 0.07$  ng/ml). In the Angus heifers, there was a tendency ( $P = 0.064$ ) for the concentration of AMH to be higher in the higher in the HFC group ( $26.9 \pm 1.4$  follicles;  $0.165 \pm 0.02$  ng/ml) comparing with the LFC

group BCF ( $9.3 \pm 0.9$  follicles;  $0.11 \pm 0.02$  ng/ml) In experiment2, pregnancy rate did not differ between HFC (39%), IFC (23%) or LFC (38%). The cows submitted to the superstimulatory protocol in experiment 3 presents higher ( $P < 0.001$ ) AMH concentration at Day 8 ( $0.99 \pm 0.38$  ng/ml) when compared with Day 5 ( $0.39 \pm 0.2$  ng/ml). Furthermore, non superstimulated cows did not change AMH concentrations at the end of TFAI protocol ( $0.33 \pm 0.15$  ng/ml) comparing with Day 5 P36 protocol. In conclusion a) Nelore heifers have a higher number of follicles when compared with Angus heifers and follicle population can be associated with plasmatic AMH concentrations, b) the number of follicles is not related to fertility in Nelore heifers, c) superstimulatory treatment increases the plasmatic AMH concentration.

Keywords: Nelore, Angus, Follicles, AMH and Fertility

## ***INTRODUÇÃO***

## 1- INTRODUÇÃO

A foliculogênese se inicia durante a vida fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para as gônadas em formação, dando origem às oôgonias. Estas se diferenciam em oócitos (iniciam o processo de divisão meiótica, que é interrompida na prófase I da meiose I até o momento da ovulação), os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais, representando um grande *pool* de reserva ovariana e a fonte da qual serão recrutados os folículos durante toda a vida (Erickson, 1966). O início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores de crescimento produzidos localmente (Mcnatty *et al.*, 1999), sendo o oócito responsável pela coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (Gilchrist, Ritter e Armstrong, 2004).

Quando o folículo apresenta o antro folicular, este já se encontra em outro estágio de desenvolvimento. Neste estágio os folículos apresentam múltiplas camadas de células da granulosa e são responsivos à ação das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH). O desenvolvimento dos folículos antrais compreende as fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

A utilização da ultrassonografia na área da reprodução permitiu um estudo mais detalhado da dinâmica folicular em bovinos. O número de ondas de crescimento folicular pode variar de 2 a 4 durante o ciclo estral, sendo mais comum a ocorrência de 2 ondas durante o ciclo de fêmeas *Bos taurus* (Sirois e Fortune, 1988) e de 3 ondas para as fêmeas *Bos indicus* (Figueiredo *et al.*, 1997; Viana Jhm, 2000; Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2007). A emergência da onda de crescimento folicular coincide com um aumento nos níveis plasmáticos de FSH (Lucy *et al.*, 1992), que é responsável pelo recrutamento de um grupo de pequenos folículos (Fortune *et al.*, 2001) e com crescimento comum por cerca de 2 a 3 dias (Ginther *et al.*, 2003; Sartorelli *et al.*, 2005; **Bastos** *et al.*, 2010).

À medida que esses folículos se desenvolvem, ocorre uma queda gradativa nas concentrações circulantes de FSH (Mihm e Austin, 2002), culminando na atresia de muitos folículos (Ginther *et al.*, 1996). Quando as

concentrações de FSH atingem níveis basais, ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda, momento denominado de desvio do crescimento folicular (Ginther *et al.*, 1997). Após o desvio, na presença de altos níveis de progesterona o folículo dominante entra em atresia, iniciando uma nova onda de crescimento folicular (Ginther, Knopf e Kastelic, 1989). Entretanto, se o folículo dominante estiver presente no momento da regressão luteínica (baixos níveis de progesterona), ocorrerá à ovulação (Fortune, Rivera e Yang, 2004).

Além do melhor conhecimento da dinâmica folicular, observou-se também que a população folicular varia enormemente entre os animais. Em média, o número de folículos recrutados durante a emergência da onda folicular pode variar de 24 folículos para novilhas Holandesas (Ginther *et al.*, 1996) a 45 para novilhas Nelore (Buratini *et al.*, 2000). Contudo, a variação no número de folículos é uma característica de alta repetibilidade entre fêmeas taurinas (Burns *et al.*, 2005), sendo possível classificar animais de alta, intermediária e baixa contagem folicular. Essa alta variação pode refletir na fertilidade e conseqüentemente interferir nos resultados das biotecnologias da reprodução, visto que animais classificados como de baixa contagem folicular, apresentam características usualmente associadas à função ovariana diminuída em animais velhos, na qual reflete a idade ovariana e uma possível infertilidade (Evans *et al.*, 2012).

O hormônio anti-mülleriano (AMH) é uma glicoproteína pertencente à família do fator de crescimento transformante tipo beta (TGF $\beta$ ), é expresso pelas células da granulosa de folículos saudáveis, apresentando maior expressão nos folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais, diminuindo sua expressão em folículos maiores (Durlinger, Visser e Themmen, 2002), em diversos mamíferos, como em ratas (Kevenaar *et al.*, 2006), mulheres (Van Rooij *et al.*, 2005) e vacas (Ireland *et al.*, 2008). Este hormônio promove um efeito inibidor no recrutamento de folículos primordiais por diminuição da sensibilidade destes ao FSH (Durlinger *et al.*, 1999). Em ratas, a presença desse hormônio foi relacionada negativamente com o número de folículos primordiais recrutados (Visser *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstram que por ser mais expresso em folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais em crescimento, as concentrações plasmáticas de AMH têm sido utilizadas como marcador da reserva ovariano em mulher (La Marca *et al.*, 2012) em vacas (Rico *et al.*, 2011). Além disso, o AMH pode ser correlacionado com o número de folículos antrais (Van Rooij *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2008). Assim como ocorre a variação no número de folículos entre os animais, as concentrações de AMH apresentam variação entre os animais, porém com pouca variação durante o ciclo estral de um mesmo animal (Ireland *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2011). Através dessas observações, a concentração de AMH passou a ser considerado como possível marcador da resposta ao tratamento superestimulatório, podendo prever a produção de embriões individualmente, tanto em mulheres (La Marca *et al.*, 2007) quanto em vacas (Rico *et al.*, 2009; Monniaux *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2011).

Os animais de raça zebuínos (*Bos indicus*) por serem mais resistentes e adaptados às condições climáticas compõem, em grande maioria, o rebanho bovino brasileiro. Visto que todos os estudos mencionados acima foram realizados em bovinos *Bos taurus* e sabendo das diferenças no desenvolvimento folicular e fisiologia ovariana existente entre essas raças, identificar os níveis séricos de AMH em animais *Bos indicus* e traçar uma relação com a população de folículos ovarianos e a fertilidade desses animais seria interessante, quer pelo conhecimento fisiológico e pelo potencial econômico desses animais na pecuária brasileira.



***HIPÓTESE E OBJETIVOS***

## **2 – HIPÓTESES**

A concentração plasmática de AMH está associada à quantidade de folículos antrais presentes nos ovários de fêmeas Nelores e Aberdeen Angus.

A fertilidade de fêmeas da raça Nelore está correlacionada à população folicular.

A concentração plasmática de AMH é alterada após superestimulação ovariana com FSH.

## **3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar a concentração de AMH entre as raças Nelore (*Bos indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus*), e correlacionar com animais de alta e baixa contagem folicular por onda.

- Comparar a concentração de AMH antes e após o tratamento superestimulatório.

- Relacionar a população folicular com a taxa de prenhes em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*).

***REVISÃO DE LITERATURA***

## 4 - REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 - Foliculogênese

A foliculogênese se inicia durante a vida fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para as gônadas em formação, dando origem às oôgonias. Estas se diferenciam em oócitos (iniciam o processo de divisão meiótica, que é interrompida na prófase I da meiose I até o momento da ovulação), os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais, representando um grande *pool* de reserva ovariana e a fonte da qual serão recrutados os folículos durante toda a vida (Erickson, 1966).

O desenvolvimento dos folículos ovarianos é coordenado por um mecanismo de comunicação celular endócrino (gonadotrofinas) e parácrino (fatores de crescimento). O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento pré-antral é controverso. Receptores do hormônio folículo estimulante (FSHR) podem ser detectados em folículos primários bovinos (Wandji, Pelletier e Sirard, 1992) e a estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançada pela adição de FSH ao meio de cultura. Entretanto, considera-se que o FSH desempenhe um papel permissivo ao invés de regulador neste estágio de desenvolvimento (Webb *et al.*, 2003). O início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores de crescimento produzidos localmente (Mcnatty *et al.*, 1999), sendo o oócito responsável pela coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (Gilchrist, Ritter e Armstrong, 2004).

O folículo passa da fase de primordial para primário, quando uma única camada das células da granulosa com formato cuboide circundam o oócito. (Eppig, 2001). Esta etapa é classificada mais como uma fase de maturação lenta do que como um processo de crescimento, uma vez que o diâmetro do oócito não apresenta grandes alterações (Van Den Hurk e Zhao, 2005). No estágio de folículo secundário, o oócito entra em extensiva fase de crescimento e é circundado por mais de uma camada de células da granulosa. Essas células são dependentes principalmente do suporte de FSH para sua manutenção e estimulação das junções gap, que permitem a transferência de

fatores de crescimento (GDF9, BMP15, Kitl) importantes para o desenvolvimento do oócito (Van Den Hurk e Zhao, 2005). Neste estágio, já é observado um pequeno antro folicular (Fair *et al.*, 1997) e também a formação de uma membrana glicoproteica ao redor do oócito, a zona pelúcida, constituída de 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3 (Anderson e Albertini, 1976).

O próximo estágio de desenvolvimento é o de folículo terciário ou antral. O antro folicular é constituído por um fluído que serve como fonte de substâncias derivadas das células foliculares e do sangue, como gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento e lipoproteínas. Os sinais para a formação do antro não são totalmente conhecidos. Estudos *in vitro* com roedores, mostram que o FSH (Mao *et al.*, 2002), LH (Cortvrindt, Hu e Smitz, 1998), activina (Zhao *et al.*, 2001) e Kitl (Driancourt *et al.*, 2000) são os possíveis candidatos para esse papel, além do EGF. Neste estágio os folículos apresentam múltiplas camadas de células da granulosa e são responsivos a ação das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH). Em bovinos, o oócito alcança diâmetro de 120 µm em folículos antrais iniciais e adquire a capacidade de reiniciar a meiose. O desenvolvimento dos folículos antrais compreende as fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

## **4.2 - Dinâmica Folicular**

O ciclo estral consiste em uma série de eventos que envolvem o crescimento e a regressão de folículos que levam de 17 a 24 dias (Bo, Baruselli e Martinez, 2003; Sartori *et al.*, 2004). Durante o ciclo estral, o crescimento e regressão de um grupo de folículos ovarianos ocorrem em um padrão de ondas (Sirois e Fortune, 1988; Ginther, Knopf e Kastelic, 1989). Estudos realizados em vacas Holandesas descreveram a ocorrência de duas e três (Sartori *et al.*, 2004) ondas de crescimento folicular, com maior prevalência de duas ondas, podendo chegar a quatro ondas de crescimento folicular (Sirois e Fortune, 1988). Outros estudos em fêmeas zebuínas, (Figueiredo *et al.*, 1997; Viana Jhm, 2000; Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2007; Mollo Mr, 2007),

observaram animais com duas, quatro e até mesmo cinco ondas durante o ciclo estral, com o maior predomínio de três ondas por ciclo estral

A emergência da onda de crescimento folicular coincide com um aumento nos níveis plasmáticos de FSH (Lucy *et al.*, 1992), que é responsável pelo recrutamento de um grupo de folículos menores que 4 mm de diâmetro (Fortune *et al.*, 2001) e com crescimento comum por cerca de 2 a 3 dias (Ginther *et al.*, 2003; Sartorelli *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010). Em média, o número de folículos recrutados durante a emergência da onda folicular pode variar de 24 folículos para novilhas Holandesas (Ginther *et al.*, 1996) a 45 para novilhas Nelore (Buratini *et al.*, 2000).

À medida que esses folículos se desenvolvem, secretam quantidades crescentes de inibina e estradiol (Wright e Malmo, 1992), levando a uma queda gradativa nas concentrações circulantes de FSH (Mihm e Austin, 2002), culminando na atresia de muitos folículos (Ginther *et al.*, 1996).

O momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda é denominado de desvio do crescimento folicular (Ginther *et al.*, 1997). Para as fêmeas taurinas o momento do desvio folicular é caracterizado quando o maior folículo atinge 8,5 mm de diâmetro (2,8 dias) (Ginther *et al.*, 1996), ao passo que para as zebuínas o maior folículo apresenta 5,4 mm em novilhas (Barros Cm, 2008) e 7 mm em vacas (Sartorelli *et al.*, 2005). Entretanto em ambas as raças o desvio acontece no mesmo período do ciclo estral.

Os mecanismos envolvidos no processo de desvio folicular são complexos e não compreendidos completamente. Sabe-se que neste momento as concentrações de FSH encontram-se em níveis basais (Ginther *et al.*, 1997). Fatores intrafoliculares são candidatos à ativação deste processo, tais como o sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), esteróides, os peptídeos ativina A/inibina A, receptores para gonadotrofinas entre outros (Berisha, Sinowatz e Schams, 2004; Fortune, Rivera e Yang, 2004; Ireland *et al.*, 2004). Porém, uma das hipóteses para este evento é a aquisição de receptores para LH (LHr) nas células da granulosa (Ginther *et al.*, 1996).

O momento em que as células da granulosa expressa o LHr funcional é controverso. Enquanto alguns autores sugerem que a aquisição de LHr nas

células da granulosa, no momento do desvio folicular, seja um fator primordial para a dominância folicular (Ginther *et al.*, 2003), outros afirmam ser um evento decorrente da dominância já instalada (Austin *et al.*, 2001; Fortune *et al.*, 2001). Barros CM, (2008) avaliaram, através de RT-PCR, o momento em que ocorre a expressão do LHr em folículos de novilhas Nelore em 3 momentos distintos da dinâmica folicular: antes (2 dias após a ovulação), durante (2,5 dias após a ovulação) e após (3 dias após a ovulação). Neste estudo, a expressão do LHr foi detectada a partir do momento do desvio folicular, indicando que a dominância folicular possivelmente seja uma condição já determinada no momento da emergência da onda.

Após o desvio, o folículo selecionado dominante continua seu crescimento, ao passo que todos os seus contemporâneos entram em atresia. Porém, na presença de altos níveis de progesterona, na fase de diestro, o folículo dominante também entra em atresia, perde sua dominância e então se inicia uma nova onda de crescimento folicular (Ginther, Knopf e Kastelic, 1989). Entretanto, se o folículo dominante estiver presente no momento da regressão luteínica (baixos níveis de progesterona), ocorrerá à ovulação (Fortune, Rivera e Yang, 2004).

### **4.3 - POPULAÇÃO FOLICULAR**

O número de oócito no ovário de mamíferos é altamente variável no nascimento. Sabe-se que em mulheres esses números variam de 350 mil a 1 milhão (Gougeon, Ecochard e Thalabard, 1994) e aproximadamente 14 mil a 250 mil em vacas (Erickson, 1966). Com o envelhecimento, o número de folículos primários, que corresponde a maior parcela da reserva ovariana, diminui rapidamente e essas reservas nunca são reestabelecidas.

Segundo Burns *et al.* (2005), a quantidade de folículos antrais é variável entre os indivíduos. Neste estudo observou-se uma variação de 7 vezes na quantidade de folículos antrais entre os animais (variação: 8-56 folículos), porém com alta repetibilidade entre os indivíduos (0,84-0,95, 1=perfeito). Após estas observações pode-se classificar as fêmeas bovinas em três grupos: de baixa (BCF), intermediária (ICF) e alta contagem folicular (ACF) (Burns *et al.*,

2005; Ireland *et al.*, 2007; Ireland *et al.*, 2008; Ireland *et al.*, 2009; Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Mossa *et al.*, 2010; Mossa *et al.*, 2012).

As fêmeas de BCF apresentam ovário 60% menor ( $3.05 \pm 0.33$  g) quando comparado as fêmeas ACF ( $7.11 \pm 0.41$  g) bem como menor quantidade de folículos e conseqüentemente, de oócitos ( $88.960 \pm 27.515$  vs  $829.185 \pm 248.327$ ; (Ireland *et al.*, 2008). Além de serem quantitativamente inferiores, as fêmeas de BCF também o são em relação à qualidade de seus folículos e oócitos quando comparadas as fêmeas de ACF. Corroborando esta afirmação, Ireland *et al.* (2009) observaram que a expressão de catepsina (enzima relacionada a apoptose celular) estava aumentada de 2 a 6 vezes nas células do *cumulus* de animais de BCF, quando comparada com as de vacas de ACF, além de uma menor expressão de genes indicadores de qualidade. Além disso, Ireland *et al.* (2008) observaram um maior número de oócitos saudáveis (40.960) em vacas com ACF em relação as vacas de BCF (1.920) Uma possível explicação para esses resultados seria a maior concentração circulante de FSH em vacas com baixa quantidade de folículos por ciclo estral (Malhi, Adams e Singh, 2005). Níveis elevados de FSH podem ser deletérios para os oócitos, pois causam um aumento na expressão gênica para aromatase nas células da granulosa e também de receptores para estrógeno nas células do *cumulus*, proporcionando níveis mais elevados de estradiol intrafolicular e conseqüentemente bloqueio na maturação oocitária (Ireland *et al.*, 2009).

Uma possível redução na fertilidade de animais de BCF também pode estar relacionada à produção de progesterona desses animais. Sabe-se que este esteroide tem uma relação positiva com a função uterina, desenvolvimento embrionário e fertilidade em espécies monovulares. Baixos níveis plasmáticos de progesterona implicam em morte embrionária e infertilidade em vacas (Diskin e Morris, 2008). Jimenez-Krassel *et al.* (2009) investigaram a possível relação da população folicular e os níveis circulantes de progesterona. Os resultados demonstraram que as fêmeas de BCF apresentaram uma redução na quantidade da enzima STAR (enzima envolvida no transporte do colesterol para membrana mitocôndria) e também uma redução na capacidade das células da granulosa do folículo dominante de se luteinizarem, promovendo assim a menor produção (30-50% menor) de progesterona quando comparada



com as fêmeas de ACF. Nesse mesmo estudo, o desenvolvimento endometrial dos animais de BCF foi menor (menor espessura) nos D0 e D6 do ciclo estral, o que poderia comprometer a porcentagem de prenhes desses animais.

A possível subfertilidade de animais de BCF foi demonstrada em alguns estudos. Cushman (Cushman *et al.*, 2009) observaram em novilhas de corte *Bos taurus* submetidas a uma estação monta com uma IA e 60 dias com touro, demonstrou maior taxa de prenhes para os animais de ACF. Recentemente, Mossa *et al.* (2012) verificaram que vacas holandesas de ACF apresentaram maior taxa de prenhes, menor intervalo entre partos e menor número de serviços durante uma estação de monta quando comparadas com vacas holandesa de baixa BCF.

Algumas hipóteses tentam explicar o porquê da variação da população folicular de fêmeas de uma mesma raça. Existem estudos em humanos, relatando que condições ambientais podem interferir na vida fetal, comprometendo o desenvolvimento, metabolismo, aumentando as chances de doenças na vida adulta (Barker, 2007). Outros estudos correlacionam à má nutrição materna com doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes no feto (Mcmillen e Robinson, 2005; De Boo e Harding, 2006), porém poucos exploraram esta correlação com a reprodução. Em estudo recente Mossa *et al.* (2013) demonstraram que a restrição alimentar da mãe durante o primeiro trimestre gestacional interfere na colonização ovariana do feto. O número de folículos antrais das proles de novilhas que sofreram restrição nutricional foi menor em todas as avaliações ultrassonográfica, antes da puberdade (7 semanas de idade) e após a puberdade (86 semanas de idade), em relação as filhas de novilhas que não sofreram restrição alimentar. Este resultado indica que a nutrição maternal é importante para a formação da reserva ovariana e posterior fertilidade da prole.

Além da nutrição, especula-se também que doenças como mastite e metrite, na fêmea adulta, podem alterar a função ovariana, retardando o crescimento folicular, diminuindo a concentração circulante e intra-folicular de estradiol, assim como a duração da fase lútea e até a interrupção da atividade cíclica (Lavon *et al.*, 2011), podendo persistir mesmo após a resolução da doença (Sheldon *et al.*, 2009). Com a instalação da infecção, os tecidos

acometidos apresentam endotoxina bacteriana, como lipopolissacarídeo (LPS), que estimulam à produção de mediadores inflamatórios, pela resposta celular (Moresco, Lavine e Beutler, 2011). Bromfield e Sheldon (2011) demonstraram que a presença do receptor de LPS nas células da granulosa de folículos antrais compromete o desenvolvimento oocitário. Além disso, em estudo *in vitro* (Bromfield e Sheldon, 2013) foi demonstrado que em cultura de 10 µg/ml LPS houve uma diminuição no pool de folículos primordiais e um maior acúmulo de mediadores inflamatórios. Como consequência dessa redução, foi observado maior ativação dos folículos primordiais, acelerando o processo de depleção da reserva ovariana.

Sabe-se que há grande diferença na quantidade de folículos recrutados entre as raças zebuínas e taurinas. De acordo com Alvarez *et al.* (2000) fêmeas da raça Brahman apresentaram maior número de folículos ( $39 \pm 4$ ), na emergência da onda em relação as fêmeas Angus ( $21 \pm 4$ ). O mesmo foi observado por Carvalho *et al.* (2008), onde novilhas *Bos indicus* (Nelore e Gir) recrutaram em média  $33,4 \pm 3,2$ , enquanto as novilhas *Bos taurus* (Angus e Holandesa) recrutaram  $25,4 \pm 2,5$  folículos. Em outro estudo, vacas Nelore recrutaram mais folículos ( $42,7 \pm 5,9$ ) quando comparadas com vacas Holandesas ( $19,7 \pm 3,2$ , Bastos *et al.*, 2010).

A diferença no pool de folículos recrutados entre as raças bovinas (e também em animais de uma mesma raça) pode ser um dos fatores, que justifiquem as disparidades nos resultados de tratamentos superestimulatórios descritas por Barros e Nogueira (2001). De fato, Ireland *et al.* (2007) observaram que novilhas de BCF apresentaram um número reduzido de embriões totais ( $4,7 \pm 0,7$ ) e também menor quantidade de embriões transferidos ( $3,8 \pm 0,8$ ) em relação às novilhas de ACF ( $10,6 \pm 2,7$  e  $5,4 \pm 1,3$ , embriões totais e transferíveis, respectivamente).

Ainda não existe uma explicação para a diferença no número de folículos entre as subespécies, entretanto, Ireland *et al.* (2008) sugerem que a variação no número de folículos antrais esteja ligada ao tamanho reserva folicular ovariana. Porém, em recente estudo Silva-Santos *et al.* (2011) observaram que o maior número de oócito recuperados através da aspiração folicular em fêmeas Nelore em relação à Angus, não foi correlacionado com a

quantidade de folículos pré-antral (primordial, primário e secundário) das reservas ovarianas. Nesse estudo, quando se realizou a contagem de folículos pré-antrais, em cortes histológicos dos ovários de fêmeas Nelore e Angus, não foi encontrada diferença nas reservas ovarianas desses animais.

A maior concentração circulante de IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1) nas fêmeas *Bos indicus* em relação as *Bos taurus*, talvez possa ser uma outra explicação para a diferença no número de folículos antrais (Alvarez *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2010). Em sistema de cultivo, em concentrações de insulina próximas às fisiológicas foi observado o desenvolvimento dos folículos pré-antrais (Fortune, Rivera e Yang, 2004). Além disso, alguns trabalhos (Gong, Bramley e Webb, 1991; Buratini *et al.*, 2000; Rico *et al.*, 2009; Rico *et al.*, 2011), mostraram que o tratamento com somatotrofina bovina (bST) aumenta a concentração plasmática de IGF1 e consequentemente o número de folículos recrutados por onda.

#### **4.4 - Hormônio Anti-Mulleriano**

O hormônio anti-mulleriano (AMH), é um membro da superfamília do fator de crescimento transformante tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e foi inicialmente identificado em fetos do sexo masculino como um fator secretado pelos testículos responsável pela regressão dos ductos mullerianos (Rico *et al.*, 2009). É produzido pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais em crescimento de vários mamíferos (Durlinger *et al.*, 1999; Rico *et al.*, 2011). Em camundongos (Kevenaar *et al.*, 2006) e também em mulheres (Van Rooij *et al.*, 2005), o avanço da senilidade, implica no decréscimo no número de folículos das reservas ovarianas e, consequentemente as concentrações de AMH também declinam.

No ovário, este hormônio promove um efeito inibidor no recrutamento de folículos primordiais por diminuição da sensibilidade destes ao FSH (Durlinger *et al.*, 1999). Em ratas, a presença desse hormônio foi relacionada negativamente com o número de folículos primordiais ativados (Visser *et al.*, 2006). A análise da foliculogênese em camundongas mutantes, que não produziam o AMH, demonstrou que estas apresentavam o número de

pequenos folículos em crescimento três vezes maior em relação às camundongas normais, acompanhado da diminuição do número de folículos primordiais, indicando que a ausência de AMH aumenta a taxa de recrutamento de folículos primordiais (Durlinger *et al.*, 1999).

Em culturas de células da granulosa, o AMH exógeno inibe a síntese e diminui a atividade da P450 aromatase, sugerindo que este hormônio atua como um fator parácrino e exerce um *feedback* negativo no desenvolvimento folicular e na proliferação das células da granulosa (Josso, Di Clemente e Gouedard, 2001; Takahashi *et al.*, 2008). Além da atuação sobre a P450 aromatase, o AMH promove uma redução na expressão mRNA do receptor de FSH, promovendo a diminuição da capacidade de resposta (Pellatt *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstram que por apresentar esse padrão de expressão (folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais), as concentrações plasmáticas de AMH têm sido utilizadas como marcador da reserva ovariano em mulher (La Marca *et al.*, 2012) em vacas (Rico *et al.*, 2011). Além disso, existe uma forte correlação entre as concentrações plasmáticas de AMH e o número de folículos antrais, o que significa que baixas concentrações de AMH coincidem com o menor número de AMH (Van Rooij *et al.*, 2005). Ireland *et al.* (2008) demonstraram que o AMH pode ser um possível marcador do tamanho da reserva ovariana e do pool de folículos em crescimento. Neste estudo foram coletadas amostra de sangue diária (de 6 a 9 dias anteriores à ovulação) para mensuração plasmática de AMH de fêmeas *Bos taurus* (Hereford X Angus X Charolês) e verificou-se que a concentração média deste hormônio foi de 2 a 6 vezes maiores nos animais de ACF e ICF vs animais BCF, apresentando correlação positiva com o número total de folículos de cada animal.

Apesar dessa variação entre os animais, as concentrações plasmáticas de AMH apresentaram variações mínimas ao longo do ciclo estral (Ireland *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2011), assim como o ciclo menstrual (La Marca *et al.*, 2007). Estes estudos claramente demonstram que uma amostra de sangue coletada em dia aleatório do ciclo estral para mensuração plasmática de AMH é, possivelmente, um marcador fenotípico do número de folículos ovariano.

Trabalhos recentes indicam que o AMH é um marcador da resposta ao tratamento superestimulatório, sendo útil para prever a produção de embriões, tanto em vacas (Rico *et al.*, 2009; Monniaux *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2011) quanto em mulheres (La Marca *et al.*, 2007). Rico *et al.* (2012) demonstraram que com apenas uma amostra de sangue coletada vários meses antes do tratamento superestimulatório ou OPU para determinação da concentração plasmática de AMH, é possível selecionar animais que responderam melhor a essas biotecnologias. O estabelecimento do perfil plasmático de AMH e a possível relação com a produção de embriões pode ser útil para selecionar vacas que produzam elevado número de embriões após aplicação das biotécnicas da reprodução (Ireland *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2012).

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 5 – REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim Sci**, v. 78, n. 5, p. 1291-302, May 2000. ISSN 0021-8812 (Print)0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **J Cell Biol**, v. 71, n. 2, p. 680-6, Nov 1976. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- AUSTIN, E. J. et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 64, n. 3, p. 839-48, Mar 2001. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. In: (Ed.). **J Intern Med**. England, v.261, 2007. p.412-7. ISBN 0954-6820 (Print)0954-6820 (Linking).
- BARROS CM, E. R., MACHADO MF, BURATINI J, PEGORER MF, SIMÕES RAL, SATRAPA RA. Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, n. 1, p. 1, 2008.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.56, 2001. p.1483-96. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).
- BASTOS, M. et al. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v. 38, p. 776, 2010.
- BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 67, n. 2, p. 162-71, Feb 2004. ISSN 1040-452X (Print)1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10386> >.
- BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. In: (Ed.). **Anim Reprod Sci**. Netherlands, v.78, 2003. p.307-26. ISBN 0378-4320 (Print)0378-4320 (Linking).
- BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.152, 2011. p.5029-40. ISBN 1945-7170 (Electronic)0013-7227 (Linking).
- BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide Reduces the Primordial Follicle Pool in the Bovine Ovarian Cortex Ex Vivo and in the Murine Ovary In Vivo. In: (Ed.). **Biol Reprod**, 2013. ISBN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking).
- BURATINI, J., JR. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. In:

(Ed.). **Theriogenology**. United States, v.54, 2000. p.421-31. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

BURNS, D. S. et al. 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. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.73, 2005. p.54-62. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

CARVALHO, J. B. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.69, 2008. p.167-75. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. In: (Ed.). **Anim Reprod Sci**. Netherlands, v.98, 2007. p.189-96. ISBN 0378-4320 (Print)0378-4320 (Linking).

CORTVRINDT, R.; HU, Y.; SMITZ, J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. **Hum Reprod**, v. 13, n. 5, p. 1292-302, May 1998. ISSN 0268-1161 (Print)0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CUSHMAN, R. A. et al. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. In: (Ed.). **J Anim Sci**. United States, v.87, 2009. p.1971-80. ISBN 1525-3163 (Electronic)0021-8812 (Linking).

DE BOO, H. A.; HARDING, J. E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. In: (Ed.). **Aust N Z J Obstet Gynaecol**. Australia, v.46, 2006. p.4-14. ISBN 0004-8666 (Print)0004-8666 (Linking).

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. In: (Ed.). **Reprod Domest Anim**. Germany, v.43 Suppl 2, 2008. p.260-7. ISBN 1439-0531 (Electronic)0936-6768 (Linking).

DRIANCOURT, M. A. et al. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. **Rev Reprod**, v. 5, n. 3, p. 143-52, Sep 2000. ISSN 1359-6004 (Print)1359-6004 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DURLINGER, A. L. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5789-96, Dec 1999. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DURLINGER, A. L.; VISSER, J. A.; THEMME, A. P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 601-9, Nov 2002. ISSN 1470-1626 (Print)1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-38, Dec 2001. ISSN 1470-1626 (Print)1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.



ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J Anim Sci**, v. 25, n. 3, p. 800-5, Aug 1966. ISSN 0021-8812 (Print)0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EVANS, A. C. et al. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 4, p. 31-7, Aug 2012. ISSN 1439-0531 (Electronic)0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x> >.

FAIR, T. et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. In: (Ed.). **Mol Reprod Dev**. United States, v.46, 1997. p.208-15. ISBN 1040-452X (Print)1040-452X (Linking).

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.47, 1997. p.1489-505. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol Reprod**, v. 65, n. 3, p. 648-54, Sep 2001. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. In: (Ed.). **Anim Reprod Sci**. Netherlands, v.82-83, 2004. p.109-26. ISBN 0378-4320 (Print)0378-4320 (Linking).

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. In: (Ed.). **Anim Reprod Sci**. Netherlands, v.82-83, 2004. p.431-46. ISBN 0378-4320 (Print)0378-4320 (Linking).

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. In: (Ed.). **Anim Reprod Sci**. Netherlands, v.78, 2003. p.239-57. ISBN 0378-4320 (Print)0378-4320 (Linking).

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v. 87, n. 1, p. 223-30, Sep 1989. ISSN 0022-4251 (Print)0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.48, 1997. p.75-87. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biol Reprod**, v. 45, n. 6, p. 941-9, Dec 1991. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J. C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. **Biol Reprod**, v. 50, n. 3, p. 653-63, Mar 1994. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IRELAND, J. J. et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. In: (Ed.). **Reprod Fertil Dev**. Australia, v.23, 2011. p.1-14. ISBN 1031-3613 (Print)1031-3613 (Linking).

IRELAND, J. J. et al. 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. In: (Ed.). **Hum Reprod**. England, v.22, 2007. p.1687-95. ISBN 0268-1161 (Print)0268-1161 (Linking).

IRELAND, J. J. et al. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.80, 2009. p.954-64. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

IRELAND, J. L. et al. Evidence for autocrine or paracrine roles of alpha2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.145, 2004. p.2784-94. ISBN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking).

IRELAND, J. J. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.79, 2008. p.1219-25. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.80, 2009. p.1272-81. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N.; GOUEDARD, L. Anti-Mullerian hormone and its receptors. In: (Ed.). **Mol Cell Endocrinol**. Ireland, v.179, 2001. p.25-32. ISBN 0303-7207 (Print)0303-7207 (Linking).

KEVENAAR, M. E. et al. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.147, 2006. p.3228-34. ISBN 0013-7227 (Print)0013-7227 (Linking).

LA MARCA, A. et al. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. In: (Ed.). **Hum Reprod**. England, v.22, 2007. p.766-71. ISBN 0268-1161 (Print)0268-1161 (Linking).

LA MARCA, A. et al. Normal serum anti-Mullerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. In: (Ed.). **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. Ireland: 2012 Elsevier Ireland Ltd, v.163, 2012. p.180-4. ISBN 1872-7654 (Electronic)0301-2115 (Linking).

LAVON, Y. et al. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. In: (Ed.). **Domest Anim Endocrinol**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.40, 2011. p.98-109. ISBN 1879-0054 (Electronic)0739-7240 (Linking).

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci**, v. 70, n. 11, p. 3615-26, Nov 1992. ISSN 0021-8812 (Print)0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.73, 2005. p.45-53. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

MAO, J. et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biol Reprod**, v. 67, n. 4, p. 1197-203, Oct 2002. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. In: (Ed.). **Physiol Rev**. United States, v.85, 2005. p.571-633. ISBN 0031-9333 (Print)0031-9333 (Linking).

MCNATTY, K. P. et al. Control of early ovarian follicular development. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 54, p. 3-16, 1999. ISSN 0449-3087 (Print)0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. In: (Ed.). **Domest Anim Endocrinol**. United States, v.23, 2002. p.155-66. ISBN 0739-7240 (Print)0739-7240 (Linking).

MOLLO MR, R. R., MARTINS AC, MATTOS MCC, LOPES JR, CARRIJO LHD, SARTORI R. Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. **Acta Sci Vet**, v. 35, p. 1, 2007.

MONNIAUX, D. et al. Anti-Mullerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? In: (Ed.). **Reprod Fertil Dev**. Australia, v.22, 2010. p.1083-91. ISBN 1031-3613 (Print)1031-3613 (Linking).

MORESCO, E. M.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. In: (Ed.). **Curr Biol**. England, v.21, 2011. p.R488-93. ISBN 1879-0445 (Electronic)0960-9822 (Linking).

MOSSA, F. et al. Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring. In: (Ed.). **Biol Reprod**, 2013. ISBN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking).

MOSSA, F. et al. Inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter in cattle. In: (Ed.). **Reprod Fertil Dev**. Australia, v.22, 2010. p.550-7. ISBN 1031-3613 (Print)1031-3613 (Linking).

MOSSA, F. et al. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. In: (Ed.). **J Dairy Sci**. United States: 2012 American Dairy Science Association. Published by Elsevier Inc, v.95, 2012. p.2355-61. ISBN 1525-3198 (Electronic)0022-0302 (Linking).

PELLATT, L. et al. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. In: (Ed.). **Fertil Steril**. United States: Crown 2011. Published by Elsevier Inc, v.96, 2011. p.1246-51 e1. ISBN 1556-5653 (Electronic)0015-0282 (Linking).

RICO, C. et al. Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. In: (Ed.). **Reprod Fertil Dev**. Australia, v.24, 2012. p.932-44. ISBN 1031-3613 (Print)1031-3613 (Linking).

RICO, C. et al. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.80, 2009. p.50-9. ISBN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking).

RICO, C. et al. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.84, 2011. p.560-71. ISBN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking).

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.63, 2005. p.2382-94. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. In: (Ed.). **J Dairy Sci**. United States, v.87, 2004. p.905-20. ISBN 0022-0302 (Print)0022-0302 (Linking).

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. In: (Ed.). **Biol Reprod**. United States, v.81, 2009. p.1025-32. ISBN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking).

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.76, 2011. p.1051-7. ISBN 1879-3231 (Electronic)0093-691X (Linking).

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol Reprod**, v. 39, n. 2, p. 308-17, Sep 1988. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKAHASHI, C. et al. Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. In: (Ed.). **Fertil Steril**. United States, v.89, 2008. p.586-91. ISBN 1556-5653 (Electronic)0015-0282 (Linking).

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.63, 2005. p.1717-51. ISBN 0093-691X (Print)0093-691X (Linking).

VAN ROOIJ, I. A. et al. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. In: (Ed.). **Fertil Steril**. United States, v.83, 2005. p.979-87. ISBN 1556-5653 (Electronic)0015-0282 (Linking).

VIANA JHM, F. A., SÁ WF ,CAMARGO ISA. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq. Agropec. Bras**, v. 35, p. 9, 2000.

VISSER, J. A. et al. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. In: (Ed.). **Reproduction**. England, v.131, 2006. p.1-9. ISBN 1470-1626 (Print)1470-1626 (Linking).

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol Reprod**, v. 47, n. 5, p. 814-22, Nov 1992. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WEBB, R. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod Suppl**, v. 61, p. 71-90, 2003. ISSN 1477-0415 (Print)1477-0415 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WRIGHT, P. J.; MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 8, n. 1, p. 57-89, Mar 1992. ISSN 0749-0720 (Print)0749-0720 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biol Reprod**, v. 65, n. 3, p. 967-77, Sep 2001. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

## CAPÍTULO 2

### RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTIMULLERIANO COM A POPULAÇÃO FOLICULAR E FERTILIDADE EM FÊMEAS BOVINAS

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação no periódico *Theriogenology*, exceto pelo idioma. Endereço eletrônico: <http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTIMULLERI  
COM A POPULAÇÃO FOLICULAR E FERTILIDADE EM FÊMEAS  
BOVINAS**

Antônio Pupulim<sup>1</sup>, Bárbara Loureiro<sup>1</sup>, Ronaldo Ereno<sup>1</sup>, Maurício Favoretto<sup>1</sup>,  
Ciro M. Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, IB, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

E-mail: [cmbarros@ibb.unesp.br](mailto:cmbarros@ibb.unesp.br)

Telefone: 014 3880 0236

## RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho, (1) identificar fêmeas *Bos indus* e *Bos taurus*, de alta e baixa contagem folicular e relacionar o número de folículos à concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano (AMH); (2) relacionar o número de folículos antrais à fertilidade de fêmeas Nelore e; (3) determinar se o tratamento superestimulatório altera as concentrações plasmáticas de AMH em vacas Nelore. No experimento 1, as novilhas foram classificadas em alta contagem folicular ou baixa contagem folicular. Foi coletada uma amostra de sangue para mensuração plasmática de AMH por ELISA. No experimento 2, foram utilizadas novilhas *Bos indicus* submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. As novilhas foram classificadas em 3 grupos: alta, intermediária e baixa contagem folicular. No experimento 3, foram utilizadas vacas *Bos indicus* de intermediária e alta contagem folicular e divididas em dois grupos: Grupo controle (inseminação artificial em tempo fixo) e grupo P36 (superestimuladas com FSH; protocolo P36). As amostras de sangue para dosagem de AMH foram obtidas no início do tratamento P36 (P36) e no final dos protocolos dos grupos. No experimento 1, os resultados foram analisados segundo o modelo de análise das variâncias. No experimento 2, foi utilizada análise de variância para determinação do número de folículos dentro de cada classificação, e um modelo de regressão logística para a influência do número de folículos na taxa de prenhez. Para as comparações da concentração de AMH foi o teste t-student utilizado para o experimento 3. No experimento 1 a contagem folicular foi maior ( $P < 0.05$ ) nas fêmeas Nelore em relação as fêmeas Angus, assim como a concentração plasmática de AMH ( $P < 0.0005$ ). A concentração plasmática de AMH diferiu ( $P < 0.04$ ) entre as fêmeas Nelore de ACF e BCF. Nas fêmeas Angus, houve uma tendência ( $P = 0.064$ ) da concentração de AMH ser maior nos animais de ACF em relação as fêmeas BCF. No experimento 2, a taxa de prenhez não diferiu entre as fêmeas de baixa, intermediária e alta contagem folicular. As vacas do grupo P36 no experimento 3 apresentaram maior ( $P < 0.001$ ) concentração de AMH no final do tratamento quando comparada ao início do tratamento. Além disso, vacas do grupo controle não sofreram alteração da concentração plasmática de AMH ao fim do protocolo em relação ao início do



protocolo P36. Conclui-se que: a) fêmeas Nelore possuem maior número de folículos em relação às Angus e que a população folicular está relacionada aos níveis plasmáticos de AMH, b) não há relação do número de folículos com a fertilidade de novilhas Nelore, c) o tratamento superestimulatório aumenta as concentrações plasmáticas de AMH.

Palavras-chave: Nelore, Angus, folículos, AMH e fertilidade.

## **Introdução**

Nos últimos anos as biotecnologias da reprodução como, inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões, têm sido amplamente utilizadas em bovinos visando maximizar o potencial genético de animais melhoradores. Entretanto, para que haja um melhor aproveitamento dessas biotecnologias, faz-se necessário um conhecimento mais detalhado da fisiologia ovariana das fêmeas bovinas.

A utilização da ultrassonografia na área da reprodução permitiu um estudo mais detalhado da dinâmica folicular em bovinos, possibilitando melhor aproveitamento das técnicas reprodutivas. Além do melhor conhecimento da dinâmica folicular, observou-se também que a população folicular varia enormemente entre os animais, mas é de alta repetibilidade entre os animais [1] ao longo da vida reprodutiva [2]. Essa alta variação pode refletir na fertilidade e conseqüentemente interferir nos resultados das biotecnologias da reprodução.

O hormônio anti-mülleriano (AMH) é uma glicoproteína pertencente à família do fator de crescimento transformante tipo beta (TGF $\beta$ ), é expresso pelas células da granulosa de folículos saudáveis, apresentando maior expressão nos folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais, diminuindo sua expressão em folículos maiores [3]. Por apresentar este padrão de expressão, a concentração circulante de AMH é possivelmente associada a reserva ovariana e ao número de folículos antrais em ratas [4], em mulheres [5] e em vacas [6], podendo ser utilizado como marcador da resposta ovariana ao tratamento superovulatório [7].

Objetivou-se com o presente trabalho: a) correlacionar as concentrações plasmáticas de AMH com a população folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus*); b) correlacionar à contagem da população folicular com a eficiência reprodutiva de novilhas Nelore nulíparas submetidas à IATF (Inseminação artificial em tempo fixo); e c) verificar se o tratamento superestimulatório com FSH altera as concentrações plasmáticas de AMH em vacas Nelore.

## **Material e Método**

### **Experimento 1: Correlação entre a concentração plasmática de AMH em novilhas Aberdeen Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) e o número de folículos antrais.**

A seleção das novilhas das raças Nelore e Angus foi realizada nas fazendas Estância Pau D'Alho (município de Vera Cruz, SP) e San Lucas (município de Cacequi, RS). Em dia aleatório do ciclo estral foi realizado exame ultrassonográfico (US, Mindray®, 5-10 MHz, China) dos ovários em um lote de 100 novilhas para cada raça. Foram selecionadas novilhas que estavam ciclando (presença de corpo lúteo) e que não apresentavam folículos > 5 mm em nenhum dos ovários. Nesta primeira avaliação foi feita a contagem da quantidade total de folículos em ambos os ovários (para cada novilha) e calculada a média da população folicular de cada raça. Essas novilhas foram sincronizadas com duas doses de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Cloprostenol sódico, 2 ml, IM, Sincrocio, Ourofino®) administrada em um intervalo de 11 dias. Quatro dias após a segunda aplicação de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  foi realizada uma segunda avaliação ultrassonográfica para confirmação do número total de folículos em cada novilha e a coleta de sangue para mensuração plasmática de AMH. Considerando a média  $\pm$  EPM da população folicular do rebanho de cada raça, as novilhas foram classificadas em alta contagem folicular (ACF; novilhas que possuíam número total de folículos acima da média  $\pm$  EPM) ou baixa contagem folicular (BCF; novilhas que possuíam número total de folículos abaixo da média  $\pm$  EPM) Selecionou-se 20 novilhas da raça Nelore, sendo 9 animais de ACF e 11 de BCF e 30 novilhas da raça Angus, sendo 15 de ACF e 15 de BCF.

## **Experimento 2: Correlação entre o número de folículos antrais e a taxa de prenhez de novilhas Nelore submetidas a IATF.**

O experimento foi realizado durante a estação de monta de 2012-2013, na Fazenda Cristal (município de Campos Novos Paulista-SP). Foram utilizadas 86 novilhas nulíparas da raça Nelore com aproximadamente 24 meses de idade, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com acesso a água e sal mineralizado *ad libitum*.

No início do protocolo de IATF (D0), dia aleatório do ciclo estral foi realizado um exame ultrasonográfico (US, Mindray®, 5-10 MHz, China), para a contagem do número total de folículos  $\geq 3$ mm presentes nos ovários de todos os animais. Mediante a obtenção da média ( $31,8 \pm 1,72$ ) do pool folicular, as novilhas foram classificadas em 3 grupo: alta (ACF; número de folículos  $>40$ ; n=29), intermediária (ICF; contagem folicular intermediária; número de folículos  $>20$  e  $<40$ ; n=34) e baixa (BCF;  $<20$  folículos; n=23) contagem de folículos antrais.

Todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF (Figura 3). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIP, 1g, Cronipress®) juntamente com benzoato de estradiol (BE 2mg, IM, BIOESTROGEN®, Biogénesis Bago, Argentina). Oito dias mais tarde (D8, às 9h da manhã) o DIP foi removido, e também foram administrada  $PGF_2\alpha$  (0,15mg de cloprostenol. IM, CRONIBEN®, Biogénesis Bago, Argentina), outra de cepionato de estradiol (5mg, IM, E.C.P.®, Pfizer) e uma dose eCG (300UI, Novormon®, Syntex, Argentina). No D10 pela manhã, foi realizado a IATF e 30 dias mais tarde foi feito o diagnóstico de gestação.



**Figura 1:** Protocolo de IATF. BE= Benzoato de estradiol; P4 = inserção do dispositivo intravaginal; US = ultrassonografia realizada no início do protocolo para contagem folicular; -P4 = retirada do dispositivo intravaginal; PGF<sub>2</sub>α = prostaglandina F<sub>2</sub>α; ECP = cipionato de estradiol; eCG = gonadotrofina coriônica equina; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

### **Experimento 3: Concentrações plasmáticas de AMH antes e após o tratamento superovulatório.**

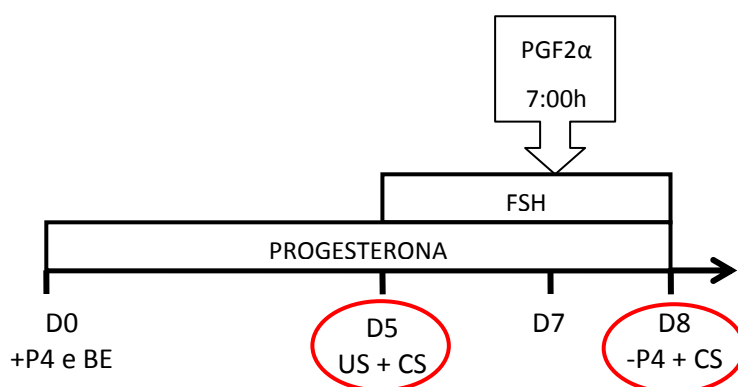
Utilizou-se vacas Nelore, primíparas (n=20) do Sítio Santo Antônio (Município de Ribeirão do Sul, SP), mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com acesso a água e sal mineralizado *ad libitum*, durante os meses de setembro a novembro de 2012.

Considerando a média da população folicular das novilhas do experimento 1, foram selecionadas 20 vacas com contagem folicular intermediária e alta. Os animais foram separadas aleatoriamente em 2 grupos: Grupo controle IATF (n=9) e grupo P36 (n=11)

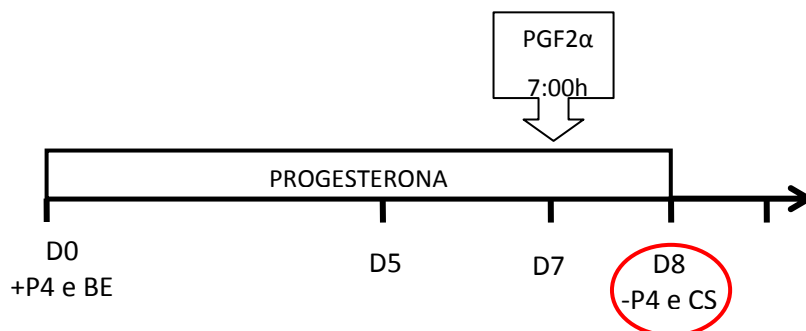
Em dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais do grupo P36 (figura 1) receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIP, 1g, PRIMER®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) juntamente com a aplicação de 3 ml de benzoato de estradiol (BE, 3mg, IM, RIC-BE®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Cinco dias mais tarde (D5) foi iniciado o tratamento superestimulatório com pFSH (200mg, Folltropin-V®, IM), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos, em doses decrescentes. No D8 pela manhã foi administrada uma dose de um análogo da PGF<sub>2</sub>α (150µg, de d-cloprostenol,

IM, Prolise®). Trinta e seis horas após (D9, às 19 h), o DIP foi removido. No D10 (manhã), a ovulação foi induzida pela aplicação de uma dose de LH (Lutropin®, 12,5mg, IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá). As amostras de sangue para mensuração plasmáticas de AMH foram obtidas no início (D5) e no final do tratamento superestimulatório (D8).

As vacas do grupo controle, receberam em dia aleatório do ciclo estral (D0), um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIP, 1g, PRIMER®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) juntamente com a aplicação de 3 ml de benzoato de estradiol (BE, 3mg, IM, RIC-BE®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). No D7 (manhã), 36 horas antes da retirada do implante, as vacas receberam uma dose de PGF<sub>2</sub>α (150µg, d-Cloprostenol, Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). No D8, às 19 h, o DIP foi removido (Figura 2). Neste grupo a coleta de sangue foi realizada apenas no D8.



**Figura 2:** Tratamento superestimulatório utilizado no grupo P36. +P4 = inserção do dispositivo intravaginal; -P4 = retirada do dispositivo intravaginal; BE = benzoato de estradiol; FSH = 200mg em doses decrescentes (D5 40%; D6 30%; D7 20%; D8 10%), em duas aplicações diárias; US = ultrassonografia realizada no D5 para confirmação da sincronização da onda folicular; PGF<sub>2</sub>α = prostaglandina F<sub>2</sub>α; CS = coleta de sangue.



**Figura 3:** Protocolo de IATF, utilizado no grupo controle. BE= Benzoato de estradiol; P4 = inserção do dispositivo intravaginal; -P4 = retirada do dispositivo intravaginal; IATF = inseminação artificial em tempo fixo;  $\text{PGF}_{2\alpha}$  = prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ; CS = coleta de sangue.

### Coleta de sangue

As coletas de sangue foram realizadas somente nos experimentos 1 e 3, nos dias específicos para cada experimento, pela veia coccígea, com tubo vacuntainer heparinizado,. Após a coleta, o sangue foi centrifugado (900Xg durante 15 minutos) para a retirada do plasma, que foi armazenado em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

### Determinação da concentração plasmática de AMH

As concentrações plasmáticas de AMH foram determinadas por meio do Kit Elisa MIS/AMH humano (DSL 10 14400-Beckman-Coulter Inc.), seguindo as instruções do fabricante, previamente validado para plasma bovino [6]. A concentração de AMH foi determinada em  $40\mu\text{l}$  de plasma não diluído, somente para o experimento 1 e 3. O coeficiente de variação do inter-ensaio foi de 7,45% e 11,9% para o intraensaio.

### Análise estatística

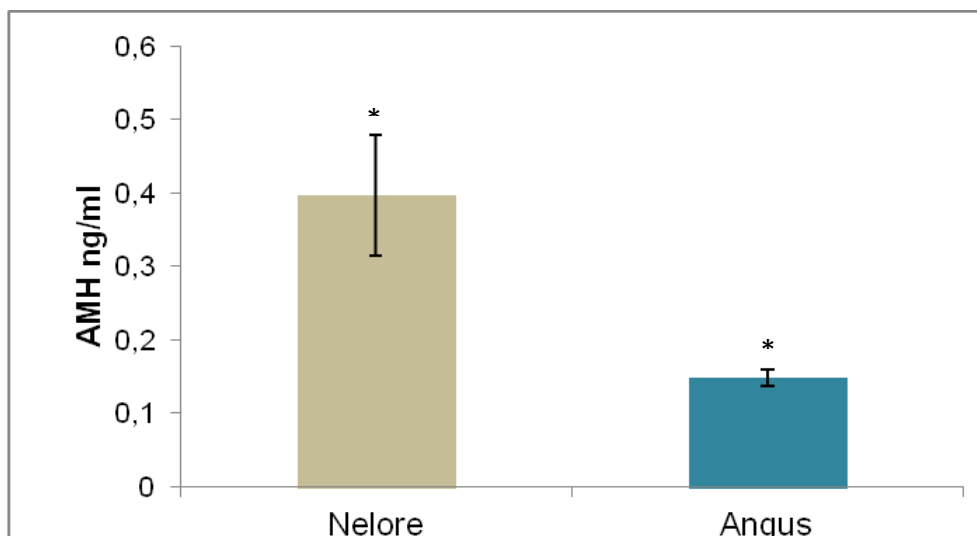
A comparação da população folicular e concentração plasmática de AMH entre as raças e os animais de ACF e BCF no experimento 1, foi analisada segundo o modelo de análise das variâncias. Para as comparações da concentração de AMH entre os grupos de ACF e BCF foi utilizado o teste de

probabilidade de diferenças individuais. No experimento 2, a concentração plasmática de AMH antes (D5) e após (D8) o tratamento superovulatório e do grupo controle (D8) com o P36 (D5), foram comparadas segundo a aplicação de teste t-student para amostras pareadas. Para o experimento 3, foi utilizada análise de variância para determinação do número de folículos dentro de cada classificação (ACF, ICF e BCF). Afim de, avaliar a influência do número de folículos na taxa de prenhez, foi ajustado um modelo de regressão logística tomando como resposta prenhez observada e prenhez não observada.

## RESULTADOS

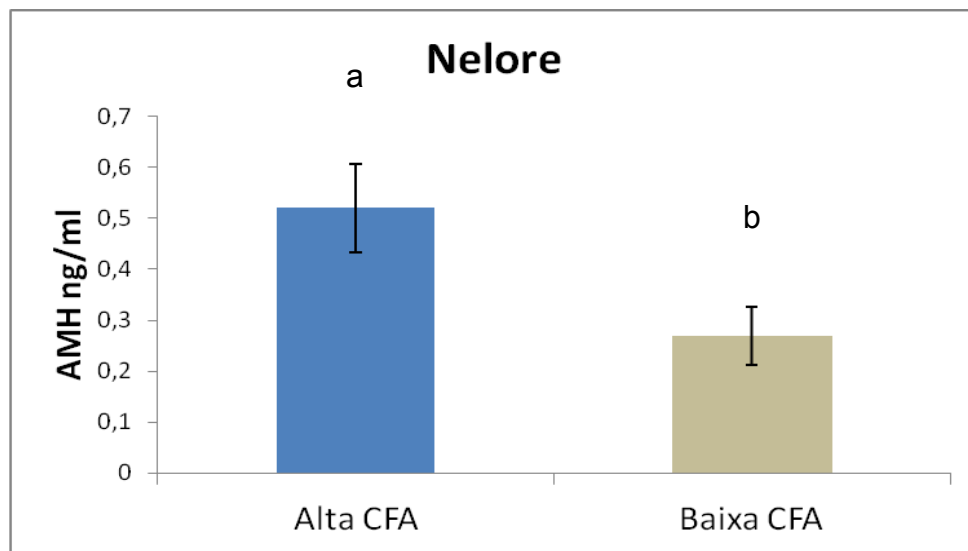
### Experimento 1: Correlação entre a concentração plasmática de AMH em novilhas Aberdeen Angus (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) e o número de folículos antrais.

As novilhas Nelore apresentaram maior população folicular em relação às novilhas Angus ( $P < 0.05$ ;  $34,4 \pm 5,4$  vs  $20 \pm 2,6$  folículos, respectivamente). As concentrações plasmáticas de AMH diferiram entre as raças ( $P = 0,0004$ ; Gráfico 1). Novilhas Nelore apresentaram maior concentração em relação às novilhas Angus,  $0,4 \pm 0,21$  ng/ml vs  $0,135 \pm 0,01$  ng/ml, respectivamente.



**GRÁFICO 1:** Média da concentração plasmática de AMH (ng/ml; eixo das ordenadas, y) das novilhas Nelore e Aberdeen Angus (eixo das abscissa, x). \* indica diferença estatística  $P = 0,0004$ .

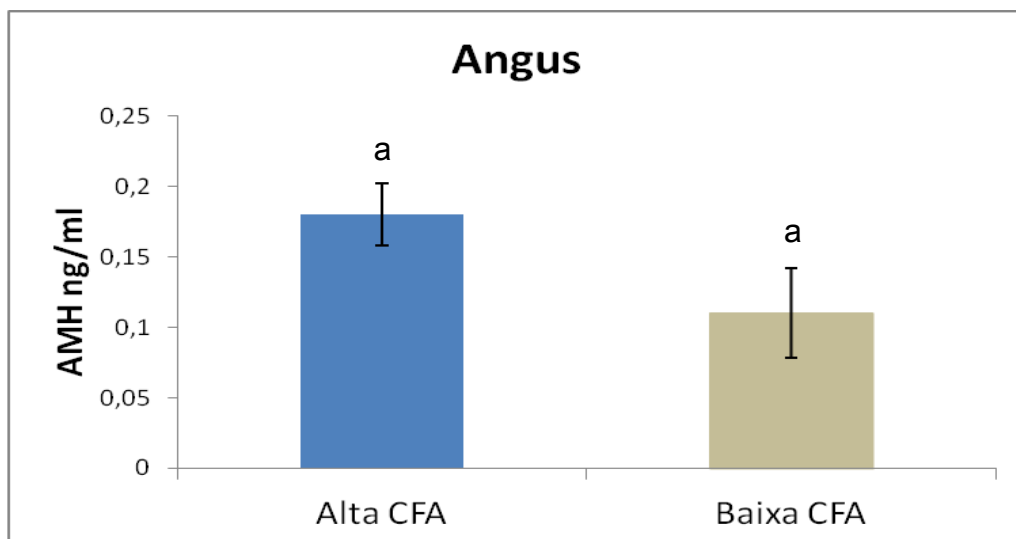
O número de folículos nos animais no grupo de ACF foi de  $59,66 \pm 2,8$  e  $26,9 \pm 1,46$  para a raça Nelore e Angus, respectivamente. Enquanto que o número de folículos nos animais do grupo de BCF foi de  $13,7 \pm 1$  e  $9,3 \pm 0,9$  para a raça Nelore e Angus, respectivamente.



**GRÁFICO 2:** Média da concentração plasmática de AMH (ng/ml; eixo das ordenadas, y) das novilhas de alta e baixa contagem de folículos antrais da raça Nelore. <sup>ab</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.  $P < 0,04$ .

A concentração de AMH foi maior ( $P < 0,04$ ; Gráfico 2) nas novilhas Nelore do grupo de ACF ( $0,52 \pm 0,07$ ) quando comparados aos do grupo de BCF ( $0,27 \pm 0,07$ ). Nos animais da raça Angus houve uma tendência ( $P = 0,064$ ; Gráfico 3) da concentração de AMH ser maior nos animais de ACF ( $0,17 \pm 0,024$ ) quando comparados aos de BCF ( $0,12 \pm 0,03$ ).





**GRÁFICO 3:** Média da concentração plasmática de AMH (ng/ml; eixo das ordenadas, y) das novilhas de alta e baixa contagem de folículos antrais da raça Angus. <sup>ab</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. P=0,064.

### Experimento 2: Correlação entre o número de folículos antrais e a taxa de prenhez de novilhas Nelore submetidas a IATF.

Para esse rebanho, a média da população folicular foi de  $31,8 \pm 1,72$  e a taxa de prenhez total do lote foi igual a 32,56%. A classificação dos animais em relação ao número total de folículos não interferiu na proporção de vacas prenhez (Tabela 1).

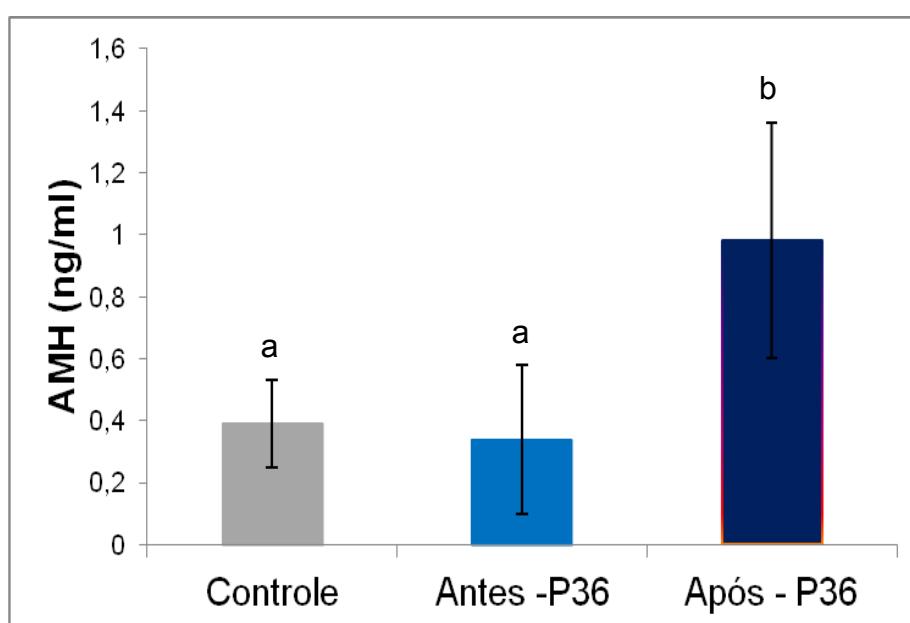
Tabela 1: Efeito da classificação das novilhas na porcentagem de prenhez.

Grupo	Número de animais	Média do número de Folículos	Porcentagem de prenhez
BCF	23	$14,6 \pm 3,7$	39% (23/9) <sup>a</sup>
ICF	34	$27,5 \pm 6,2$	23% (34/8) <sup>a</sup>
ACF	29	$50,5 \pm 9,2$	38% (29/11) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> letras diferentes indicam diferença estatística. P=0.357

### Experimento 3: Concentrações plasmáticas de AMH antes e após o tratamento superovulatório.

Houve efeito do tratamento superestimulatório sobre as concentrações de AMH para o grupo P36 ( $p < 0.001$ ): no grupo P36, as concentrações plasmáticas de AMH aumentaram de  $0,39 \pm 0.23$  ng/ml (D5) para  $0,99 \pm 0.38$  ng/ml (D8). Não houve diferença ( $P=0,5544$ ) na concentração plasmática de AMH nos animais do grupo controle ( $0,33 \pm 0.15$  ng/ml; amostra coletada no D8 do protocolo de IATF) em relação à concentração plasmática de AMH no D5 (início do tratamento superestimulatório) do grupo P36 ( $0,39 \pm 0.23$  ng/ml; Gráfico 4).



**GRÁFICO 4:** Concentração plasmática de AMH (ng/ml) em vacas primíparas da raça Nelore submetidas ao protocolo de IATF (Controle) e ao protocolo de superestimulação (P36). Letras diferentes indicam diferença estatística.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho observou-se maior quantidade de folículos antrais nas novilhas da raça Nelore em relação as da raça Angus. Também foi observado que as concentrações plasmáticas de AMH podem ser relacionadas ao número de folículos antrais das fêmeas bovinas.

O número de folículos antrais contados nos exames ultrassonográficos das novilhas Nelore e Angus deste experimento corroboram estudos anteriores

em raças zebuínas (Nelore, Brahman e Gir) e taurinas (Holandesa e Angus), em que fêmeas *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos na emergência da onda quando comparadas às *Bos taurus* [8-11].

A diferença na quantidade de folículos antrais presentes nos ovários de novilhas Nelores e Angus talvez possam ser explicadas por diferenças fisiológicas entre essas duas raças. Uma delas seria a menor concentração de FSH circulante encontrada em fêmeas zebuínas quando comparadas com as taurinas. Alvarez *et al.* (2000) [8] verificaram que vacas da raça Brahman apresentaram maior número de folículos e menores concentrações de FSH que as vacas Angus. Esses mesmo autores verificaram que além das diferenças nas concentrações de FSH, os níveis plasmáticos de IGF-1 circulantes foram maiores nas vacas Brahman. O mesmo resultado foi observado em vacas Nelore em relação às vacas Holandesas [10]. Outros estudos demonstram que a utilização de bST (somatotrofina bovina) aumenta os níveis circulantes de IGF-1 e também o número de folículos recrutados [11, 12], confirmando a hipótese da participação do sistema IGF na quantidade de folículos recrutados por onda. Sugere-se que o maior número de folículos antrais observados em vacas zebuínas, embora apresentem menores concentrações de FSH, seja devido às maiores concentrações de IGF-1, quando comparados às taurinas [8].

Nossos resultados demonstraram que é possível classificar novilhas Nelore e Angus em animais de ACF e BCF. Em 2 avaliações ultrassonográficas, realizadas a cada 15 dias, observou-se que não houve variação na quantidade de folículos contados, confirmando a alta repetibilidade deste fenótipo na espécie bovina.

Outros autores [1, 6] já haviam demonstrado esta variação entre animais da mesma raça (variação: 8-56 folículos) e a alta repetibilidade de cada indivíduo. Através dessas observações, a contagem de folículos antrais passou a ser considerada uma característica fenotípica de cada animal, tornando possível a classificação de fêmeas bovinas em BCF, ICF e ACF.

Esta variação na contagem folicular que ocorre entre os indivíduos de uma mesma raça, pode ser uma consequência do ambiente uterino materno. Em estudo recente, Mossa *et al.*, 2013 [13] observaram que fêmeas que

passaram restrição alimentar no terço inicial da gestação, apresentavam maior concentração de testosterona, além disso, produziram proles com menor número de folículos quando comparado com produtos oriundos de mães sem restrição alimentar. Adicionalmente, estudos *in vitro* [14] ou *in vivo* em ovelhas [15, 16], camundongas [17] e macacas [18] mostraram que um aumento na concentração de testosterona causa ativação dos folículos primordiais e depleção precoce da reserva ovariana.

Nosso trabalho comparou, pela primeira vez, a concentração plasmática de AMH de novilhas *Bos indicus* com a de novilhas *Bos taurus*. As concentrações plasmáticas de AMH foram maiores em novilhas da raça Nelore quando comparadas às Angus. Além disso, também foi observada uma diferença na concentração plasmática deste hormônio entre as fêmeas de ACF (maior concentração) e BCF (menor concentração) da raça Nelore. Nas novilhas da raça Angus foi observada uma tendência de aumento para as fêmeas de ACF.

Esses resultados já eram esperados, pois a secreção de AMH ocorre, nas células da granulosa, preferencialmente nos folículos em crescimento, a partir de 1,5 até 5 mm de diâmetro, no estágio pré-antral e pequenos folículos antrais [6, 19], e conseqüentemente, os animais com maior quantidade de folículos ao exame ultrassonográfico, teriam maiores concentrações circulantes de AMH. Vale ressaltar que o intervalo para o estabelecimento dos grupos de BCF e ACF foi menor nos animais da raça Angus (15<23) quando comparados aos animais da raça Nelore (20<44), talvez por isso não tenha sido observado uma diferença estatisticamente significativa na concentração de AMH entre os grupos da raça Angus.

A quantidade de folículos recrutados por onda parece não interferir na fertilidade de animais submetidos aos protocolos de IATF. Nas novilhas Nelore não houve diferença na taxa de prenhez entre os animais de ACF, ICF e BCF. Este resultado também foi confirmado por Starbuck-Clemmer *et al.*, 2007 [20] que observaram influência do número de folículos  $\geq 4$  mm de diâmetro na taxa de prenhez. Mossa *et al.*, 2012 [21] relataram que, ao primeiro serviço, a taxa de prenhez foi igual entre fêmeas de ACF e BCF. Entretanto, ao final da estação reprodutiva as fêmeas de BCF apresentaram maior número de serviço

por prenhez, maior intervalo entre partos e menor taxa de prenhez em relação às de alta contagem de folículos antrais. O fato de utilizar a observação de cio e 12 horas mais tarde realizar a IA possa ter aumentado a taxa de prenhez nos animais ACF em relação aos animais de BCF, enquanto o protocolo de IATF possa favorecer os animais de BCF por sincronizar a onda de crescimento folicular e conseqüentemente a ovulação.

Com relação às concentrações plasmáticas de AMH de vacas superestimuladas, observamos que houve variação na concentração de AMH durante o tratamento superestimulatório. No grupo P36 a concentração plasmática AMH no primeiro dia do tratamento com FSH foi estatisticamente inferior em relação a concentração plasmática de AMH no último dia do tratamento com FSH. A concentração plasmática de AMH do grupo controle (sem tratamento superestimulatório) foi semelhante à concentração no início do tratamento superestimulatório e diferente da concentração do último dia do tratamento com FSH. Corroborando nossos resultados Rico *et al.*, 2009 [7] observaram um aumento no AMH plasmático da primeira aplicação de FSH (0.025 a 0.228 ng/ml) para o estro (0.049 a 0.359 ng/ml) em novilhas Holandesas.

Uma possível explicação para o aumento nas concentrações plasmáticas de AMH, do início para o final do tratamento superestimulatório, seria a aplicação de FSH, no momento da emergência da onda, aumentando o número de folículos em desenvolvimento, momento em que eles estão no ápice da produção de AMH [19, 22]. Essa concentração elevada de AMH pode influenciar negativamente o recrutamento de folículos nas ondas subsequentes. Como a meia vida deste hormônio é de aproximadamente 8 dias, em mulheres [23], especula-se que seus efeitos possam perdurar durante a fase de transição de folículo primário a antral, que é em torno de 90 dias [24] o que poderia comprometer as respostas em sucessivos tratamentos superestimulatórios.

Conclui-se que: a) a diferença na concentração plasmática de AMH pode ser utilizada como indicador do número de folículos antrais, b) a contagem de folículos antrais não influencia a taxa de prenhez após IATF, c) animais submetidos a tratamento superestimulatório apresentaram um aumento na concentração plasmática de AMH.

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesses.

## Financiamento

Este projeto foi financiado pela FAPESP – projeto 2011/50964-0 e Bolsa de Mestrado 2011/15373-1

## Agradecimentos

Os autores agradecem o Departamento de Farmacologia da UNESP e a fazenda Cristal.

## REFERÊNCIAS

- [1] Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod. United States*2005. p. 54-62.
- [2] Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* 1966;25:800-5.
- [3] Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction.* 2002;124:601-9.
- [4] Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, et al. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology. United States*2006. p. 3228-34.
- [5] van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril. United States*2005. p. 979-87.
- [6] Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod. United States*2008. p. 1219-25.
- [7] Rico C, Fabre S, Medigue C, di Clemente N, Clement F, Bontoux M, et al. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod. United States*2009. p. 50-9.
- [8] Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Jr., Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci.* 2000;78:1291-302.
- [9] Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology. United States*2008. p. 167-75.
- [10] Bastos M, Mattos M, Meschiatti M, Surjus R, Guardieiro M, Ferreira J, et al. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2010;38:776.

- [11] Buratini J, Jr., Price CA, Visintin JA, Bo GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*. United States 2000. p. 421-31.
- [12] Gong JG, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod*. 1991;45:941-9.
- [13] Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JL, et al. Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring. *Biol Reprod* 2013.
- [14] Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fertil*. 1998;113:27-33.
- [15] Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology*. United States 2005. p. 3185-93.
- [16] Smith P, Steckler TL, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep. *Biol Reprod*. United States 2009. p. 726-36.
- [17] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000;21:200-14.
- [18] Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod*. 1999;14:2328-32.
- [19] Rico C, Medigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clement F, et al. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod*. United States 2011. p. 560-71.
- [20] Starbuck-Clemmer MJ, Hernandez-Fonseca H, Ahmad N, Seidel G, Inskeep EK. Association of fertility with numbers of antral follicles within a follicular wave during the oestrous cycle in beef cattle. *Reprod Domest Anim*. Germany 2007. p. 337-42.
- [21] Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, et al. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. United States: 2012 American Dairy Science Association. Published by Elsevier Inc; 2012. p. 2355-61.
- [22] Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, et al. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*. 1995;136:4951-62.
- [23] Griesinger G, Dafopoulos K, Buendgen N, Cascorbi I, Georgoulas P, Zavos A, et al. Elimination half-life of anti-Mullerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. United States 2012. p. 2160-3.
- [24] Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev*. Australia 2011. p. 444-67.