



RENATA MACULAN

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS INDICADORAS DE
FERTILIDADE NA PREDIÇÃO DO POTENCIAL
REPRODUTIVO DE FÊMEAS E MACHOS *BOS TAURUS* E *BOS
INDICUS***

**LAVRAS - MG
2018**

RENATA MACULAN

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS INDICADORAS DE FERTILIDADE NA
PREDIÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE FÊMEAS E MACHOS *BOS TAURUS*
E *BOS INDICUS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Maculan, Renata .

Utilização de características indicadoras de fertilidade na
predição do potencial reprodutivo de fêmeas e machos *Bos taurus* e
Bos indicus / Renata Maculan. - 2018.

97 p.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
Bibliografia.

1. Circunferência escrotal. 2. Contagem folicular antral. 3.
Eficiência reprodutiva. I. Souza, José Camisão de. . II. Título.

RENATA MACULAN

**UTILIZAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS INDICADORAS DE FERTILIDADE NA
PREDIÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE FÊMEAS E MACHOS *BOS TAURUS*
E *BOS INDICUS***

**USE OF FERTILITY INDICATOR CHARACTERISTICS IN THE PREDICTION
OF THE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF *BOS TAURUS* AND *BOS INDICUS*
FEMALES AND MALES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 11 de setembro de 2018.

Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira	EPAMIG
Dr. Gustavo Augusto de Andrade	IFSULDEMINAS
Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles	UFLA

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

*À Deus por sua infinita bondade
Às minhas filhas Paola e Elisa por serem a razão de todos os meus esforços
Aos meus pais por terem doado suas vidas em função da minha felicidade
Ao meu esposo pelo companheirismo, incentivo e amor e muita paciência
Á minha irmã e minha sobrinha pelas palavras de apoio e carinho
Á todos os meus amigos pela imensurável ajuda ofertada para a realização deste
trabalho
Com amor
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser a luz que guia os meus passos. A força dos céus desce sobre mim me incentivando a nunca desistir. Eu te agradeço meu Deus pela saúde e proteção que me concede a cada dia e por colocar pessoas boas em meu caminho.

Às minhas filhas Paola e Elisa por serem a razão do meu existir. Mesmo antes de conhecê-las, sempre lutei para proporcionar o melhor para quando Deus às enviasse em minha vida. Agora posso dizer que sou feliz pois conheço o verdadeiro amor, o amor de mãe.

Aos meus pais Dimas e Ana Alice por todo o sacrifício que fizeram durante toda a vida para me criar e educar da melhor maneira possível. Por todas as vezes que abdicaram da própria felicidade em função da minha. Espero ser para minhas filhas pelo menos a metade do que vocês significam para mim.

Ao meu esposo Thales por me incentivar e apoiar por tantos anos. Por ter paciência, amor e solidariedade nos momentos difíceis que passei. Você me concedeu a dádiva de ser mãe e ter uma família. Você é um anjo que Deus colocou em minha vida.

À minha irmã Fabiana e a minha sobrinha Lavínea por serem sempre lugar de refúgio e de confidências. Obrigada por sempre estar disponível nos momentos em que eu mais precisei. Obrigada Lavínea pelos sorrisos que me alegraram nos momentos difíceis

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

À Fazenda Casa Branca Agropastoril, no nome do Heitor Pinheiro, pela cooperação e pelo aceite na realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor José Camisão de Souza, pela orientação, paciência e disposição para ajudar. Devo grande parte do que sou profissionalmente e pessoalmente aos seus ensinamentos e exemplos. São os muitos anos em sua companhia que me fizeram a profissional que sou hoje.

Aos membros da banca de doutorado pela solicitude em contribuir no engrandecimento deste trabalho.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e auxílio na realização deste trabalho. Agradeço especialmente aos meus amigos Gabriel Miranda, Gisvani Lopes, Cintia Vanin e

Natália Alves por se fazerem presentes nos momentos mais importantes da minha vida e por me auxiliarem tanto na realização deste trabalho. Agradeço imensamente e serei eternamente grata a vocês.

A todos funcionários do DZO/UFLA.

MUITO OBRIGADA!

*“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.
Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás;
a sua verdade será o teu escudo e broquel.
Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,
Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio-dia.
Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti. ”*

(Salmos 91:1-8).

RESUMO

Foi avaliada a influência das concentrações séricas do hormônio anti-Mülleriano (AMH) sobre a fertilidade de fêmeas e a detecção da puberdade precoce em machos de diferentes grupos genéticos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*). Ademais, o tamanho e a funcionalidade de estruturas reprodutivas (ovários, testículos, vulva) foram mensuradas com o intuito de verificar as possíveis relações com medidas de fertilidade e precocidade. Nas fêmeas, classes de largura vulvar (CLV pequena: <86mm e CLV grande: ≥86mm), escore de tamanho ovariano (pequeno, médio e grande), classe de AMH (baixo: <0,81ng/mL e alto: ≥0,81ng/mL) e a CFA foram determinados em fêmeas Brahman, Angus e Simental. Índices de eficiência reprodutiva retirados a partir do banco de dados da propriedade foram relacionados com as mensurações realizadas. Nos machos (Brahman e Simental), a circunferência escrotal (CE) foi mensurada em três períodos (pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual) utilizando-se fita métrica flexível. A concentração de AMH foi mensurada na pré-puberdade (9 meses para os Simental e 20 meses para os Brahman) e os animais foram classificados em AMH baixo (<2,28 ng/mL) e AMH alto (≥2,28 ng/mL). A avaliação andrológica foi realizada na puberdade e na maturidade sexual com o objetivo de correlacionar os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen com as mensurações realizadas. Nas fêmeas zebuínas em comparação às taurinas, a CFA (36,30±1,34 vs. 22,09±1,67), CLV (106,94±15,83 vs. 69,78±14,11mm) e AMH (1,18±0,07 vs. 0,42±0,05 ng/mL) foram superiores. A CFA (36,10±1,90 vs. 22,78±1,64), o AMH (1,17±0,07 vs. 0,48±0,007 ng/mL) e oócitos viáveis (18,86±1,76 vs. 10,15±1,49) foram superiores (P < 0,05) na CLV grande comparada à pequena, respectivamente. Não foram observados (P>0,05) efeitos das CLV, AMH e CFA e os índices de eficiência reprodutiva. Nos machos, a CE foi negativamente correlacionada com a porcentagem de defeitos totais (r=-0,5957; P=0,0246) e positivamente com a porcentagem de espermatozoides normais (r=0,595; P=0,0265). A CE foi superior (P=0,0002) para os animais da classe de AMH baixo (34,78±78) em comparação com o alto (32,47±0,42). Machos classificados como baixo AMH obtiveram melhores (P<0,05) resultados (vigor: 3,92±0,20; turbilhonamento: 2,63±0,19; motilidade progressiva: 77,55±3,80) no exame andrológico quando comparados aos de alto AMH (vigor: 3,33±0,19; turbilhonamento: 2,06±0,19; motilidade progressiva: 65,14±3,79). Conclui-se que, em fêmeas Brahman, Angus e Simental, a largura vulvar foi um bom preditor da CFA e das concentrações de AMH em ambos os grupos genéticos. Os marcadores estudados tiveram efeito positivo sobre o número de oócitos viáveis, portanto, se mostraram viáveis para a seleção de doadoras nas condições deste experimento. Nos machos, a concentração de AMH associada com a CE no período da pré-puberdade foram bons preditores da precocidade sexual em touros das raças Brahman e Simental.

Palavras-chave: AMH. Circunferência escrotal. Contagem folicular antral. Eficiência reprodutiva. Largura vulvar. Puberdade.

ABSTRACT

Were evaluated the influence of serum concentrations of the Anti-Mullerian hormone on the fertility of females and the detection of precocious puberty in males of different genetic groups (*Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*). In addition, the size and functionality of reproductive structures (ovaries, testicles, vulva) were measured in order to verify possible relationships with fertility and precocity measures. In females, classes of vulvar width (small VWC ≤ 86 mm and large VWC: >86 mm), ovarian size score (small, medium and large), class of AMH (low: ≤ 0.81 ng/mL and high: >0.81 ng/mL) and AFC were determined in Brahman, Angus and Simental females. Reproductive efficiency indexes taken from the property database were related to the measurements taken. In males (Brahman and Simental), scrotal circumference (SC) was measured in three periods (pre-puberty, puberty and sexual maturity) using a flexible tape measure. AMH concentration was measured at pre puberty (9 months for Simental and 20 months for Brahman) and the animals were classified as low AMH (<2.28 ng/mL) and high AMH (≥ 2.28 ng/mL). The andrological evaluation was performed at puberty and sexual maturity with the objective of correlating the physical and morphological parameters of the semen with the measurements made. In zebu females compared to taurines, AFC (36.30 ± 1.34 vs. 22.09 ± 1.67), VWC (106.94 ± 15.83 vs. 69.78 ± 14.11 mm) and AMH (1.18 ± 0.07 vs. 0.42 ± 0.05 ng/mL) were higher. AFC (36.10 ± 1.90 vs 22.78 ± 1.64), AMH (1.17 ± 0.07 vs. 0.48 ± 0.007 ng/mL) and viable oocytes (18.86 ± 1.76 vs 10.15 ± 1.49) were higher ($P < 0.05$) in the large VWC compared to the small VWC, respectively. The effects of VWC, AMH and reproductive efficiency indexes were not observed ($P > 0.05$). In males, the EC was negatively correlated with the percentage of total defects ($r = -0.5957$; $P = 0.0246$) and positively with the percentage of normal spermatozoa ($r = 0.595$; $P = 0.0265$). SC was higher ($P = 0.0002$) for animals of the low AMH class (34.78 ± 78) compared to high (32.47 ± 0.42). Males classified as low AMH obtained better ($P < 0.05$) results (vigor: 3.92 ± 0.20 , swirling: 2.63 ± 0.19 , progressive motility: 77.55 ± 3.80) in the andrological exam when compared to those with high AMH (vigor: 3.33 ± 0.19 , swirling: 2.06 ± 0.19 , progressive motility: 65.14 ± 3.79). It was concluded that, in Brahman, Angus and Simental females, vulvar width was a good predictor of AFC and AMH concentrations in both genetic groups. The markers studied had a positive effect on the number of viable oocytes, therefore, they proved viable for donor selection under the conditions of this experiment. In males, the concentration of AMH associated with EC in the pre-puberty period were good predictors of sexual precocity in bulls of the Brahman and Simental breeds.

Keywords: AMH. Scrotal circumference. Antral follicle count. Reproductive efficiency. Vulva width. Puberty.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Ações do AMH sobre a foliculogênese.....26

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1. Largura vulvar medida com paquímetro digital.68

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1. Efeito do tamanho ovariano sobre a contagem folicular antral (CFA) em fêmeas bovinas.....	70
Tabela 2. Efeito da classe de largura vulvar (CLV) sobre a contagem folicular antral (CFA) de acordo com o grupo genético.....	70
Tabela 3. Efeito da classe de tamanho ovariano (CTO) sobre a largura vulvar (mm).	71
Tabela 4. Efeito da classe de largura vulvar (CLV) sobre as concentrações do hormônio anti-Mülleriano (AMH) de acordo com o grupo genético.....	71
Tabela 5. Efeito da classe de tamanho ovariano (CTO) sobre as concentrações de AMH (ng/mL) em taurinos e zebuínos.....	72
Tabela 6. Efeito da classe de AMH sobre a contagem folicular antral (CFA) em fêmeas taurinas e zebuínas.	73

ARTIGO 2

Tabela 1. Efeito da raça sobre os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen em touros das raças Brahman e Simental na idade à puberdade.	89
Tabela 2. Efeito do período reprodutivo sobre os parâmetros seminais em touros das raças Brahman e Simental.	89
Tabela 3. Efeito da classe de AMH sobre a qualidade seminal em touros das raças Brahman e Simental puberais.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

B.	Bos
vs.	Versus
et al.	E outros
E.P.M.	Erro padrão da média
S.E.	Erro padrão

LISTA DE SIGLAS

AMH	Hormônio anti-Mülleriano
CE	Circunferência escrotal
CEP	Código de Endereçamento Postal
CFA	Contagem Folicular Antral
CLV	Classe de largura vulvar
CTO	Classe de tamanho ovariano
DEFM	Defeitos espermáticos maiores
DEFMEN	Defeitos espermáticos menores
DEFT	Defeitos espermáticos totais
ECC	Escore de condição corporal
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IDP	Intervalo de parto
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina– 1
IPP	Idade ao primeiro parto
IPPS	Intervalo parto ao primeiro serviço
LH	Hormônio luteinizante
MG	Minas Gerais
MN	Monta natural
OPU	Técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia
OV	Número médio de oócitos viáveis
P450c17	Aromatase P450c17
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVC	Policloreto de polivinila
RNA _m	Ácido ribonucleico
SAS	Statistical Analysis System
SC	Número de serviços por concepção
SRY	Sex-determining region of Y chromosome
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
UFLA	Universidade Federal de Lavras

LISTA DE SÍMBOLOS

G	Grande
G	Gauge
g	Gramma
kd	Kilodauton
kg	Quilograma
µm	Micrômetro
M	Médio
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Militros
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
N	Novilha
n	Número
ng	Nanograma
P	Pequeno
P	Probabilidade
pH	Ponte de hidrogênio
r	Coefficiente de correlação de Pearson
V	Vaca
x	Cruzamento
X	Aumento

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Anatomia do sistema reprodutor de fêmeas bovinas	18
2.2	Morfometria da genitália externa	19
2.3	Desenvolvimento, crescimento e maturação de oócitos em bovinos	21
2.3.1	Oogênese e foliculogênese	21
2.3.2	Controle hormonal do desenvolvimento folicular	23
2.4	Hormônio anti-Mülleriano (AMH) em fêmeas	24
2.5	Contagem folicular antral (CFA)	28
2.6	Fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas (<i>Bos taurus indicus</i>) e taurinas (<i>Bos taurus taurus</i>)	32
2.7	Anatomia do sistema reprodutor de machos bovinos	34
2.8	Espermatogênese	36
2.9	Características indicadoras de fertilidade em machos bovinos	38
2.9.1	Puberdade em machos bovinos	39
2.9.2	Exame andrológico	41
2.9.3	Circunferência escrotal	43
2.9.4	Hormônio anti- Mülleriano (AMH) em machos	45
3	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	64
	ARTIGO 1 RELAÇÕES ENTRE CONTAGEM FOLICULAR ANTRAL, LARGURA VULVAR, CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO E FERTILIDADE EM FÊMEAS <i>BOS TAURUS</i> E <i>BOS INDICUS</i>	64
	ARTIGO 2 CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO (AMH) COMO PREDITOR DA PUBERDADE EM MACHOS DAS RAÇAS BRAHMAN E SIMENTAL	84

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino vem sendo submetido à um intenso processo de seleção visando o aumento dos índices produtivos. Entretanto, como consequência desse processo, a eficiência reprodutiva vem sendo afetada de forma negativa. O processo de seleção para características reprodutivas é dificultado pelo longo período de avaliação e da baixa herdabilidade das características reprodutivas (MACULAN et al., 2018). Desta forma, a busca por características que possam indicar precocemente o potencial reprodutivo de fêmeas e machos bovinos é de suma importância para o sucesso do melhoramento genético.

O tamanho de estruturas reprodutivas pode ser indicativo de maior fertilidade em bovinos de ambos os sexos. Em fêmeas, o tamanho ovariano é um bom preditor da reserva folicular e da funcionalidade ovariana (IRELAND et al., 2008; MODINA et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que a largura vulvar é um preditor da reserva folicular ovariana e do potencial reprodutivo em fêmeas zebuínas (MESQUITA et al., 2016; MACULAN et al., 2018). Entretanto, é preciso investigar a influência de alguns fatores (idade, situação reprodutiva, condição corporal e grupo genético) que podem interferir nas mensurações genitais para comprovar a sua aplicabilidade. Em machos, a circunferência escrotal é uma mensuração amplamente utilizada como preditor da capacidade reprodutiva. Tal mensuração é indicativo de melhor desempenho reprodutivo sendo uma medida de alta repetibilidade e herdabilidade e correlacionada positivamente com a produção espermática e precocidade sexual (FRENEAU, 1991; PACHECO, 2005; CORBET et al., 2013).

A reserva folicular ovariana é outra característica amplamente investigada em fêmeas. Sua avaliação é feita a partir da contagem dos folículos antrais (CFA) visualizados via avaliação ultrassonográfica (SILVA-SANTOS et al., 2014). A associação positiva entre CFA e índices reprodutivos tem sido amplamente relatada na literatura (MERCÉ et al., 2006; CHACUR et al., 2006; CUSHMAN et al., 2009; IRELAND et al., 2011; PFEIFFER et al., 2014; MESQUITA et al., 2016). Não parece haver dúvidas que a CFA influencia de forma positiva os resultados obtidos através das biotecnologias reprodutivas (IRELAND et al., 2008; SANTOS et al., 2016). Entretanto, quando se avalia os resultados em relação aos índices de reprodução a campo, os

dados ainda são controversos (ALVAREZ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; CUSHMAN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2016; MACULAN et al., 2018).

Outro marcador de fertilidade que vem sendo amplamente investigado em machos e fêmeas é a concentração do hormônio anti-Mülleriano (AMH). O AMH é uma glicoproteína dímica que desempenha importante função no sistema reprodutor. Em fêmeas, o AMH atua como modulador da atresia folicular e é um indicador de maior reserva folicular ovariana (IRELAND et al., 2008; RICO et al., 2009; MONNIAUX et al., 2013; BATISTA et al., 2014). Entretanto, o efeito da concentração plasmática do AMH no desempenho reprodutivo ainda é pouco estudado. Em machos, a expressão reduzida de AMH pelas células de Sertoli está diretamente relacionada com a produção de testosterona e o aparecimento da espermatogênese nos túbulos seminíferos (ALMEIDA et al., 2012). Desta forma, o AMH pode atuar como marcador de puberdade precoce podendo auxiliar o processo de seleção para precocidade sexual (KITAHARA et al., 2016).

O objetivo desse estudo será avaliar, em *Bos taurus* e *Bos indicus*, a influência das concentrações séricas do hormônio anti-Mülleriano sobre a fertilidade de fêmeas e a detecção da puberdade precoce em machos. Ademais, objetiva-se correlacionar o tamanho e a funcionalidade de estruturas reprodutivas (ovários, testículos, genitália externa) com a fertilidade em machos e fêmeas taurinos e zebuínos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia do sistema reprodutor de fêmeas bovinas

O aparelho reprodutor de fêmeas pode ser dissociado em componentes relacionados com a produção e transporte de ovócitos (ovários, ovidutos) e aqueles envolvidos na gestação e copulação (útero e órgão copulatórios).

Os ovários, são órgão localizados na cavidade pélvica, situados nas extremidades dos cornos uterinos. Possuem forma oval e o tamanho varia de 1,5 a 5 cm de comprimento e entre 1 a 3 cm de diâmetro, podendo alterar conforme o estágio reprodutivo. Sua principal função é a produção e maturação dos gametas e a secreção de hormônios esteroides (BALL; PETER, 2004). Morfologicamente pode ser dividido em córtex e medula. A região medular é composta por tecidos conectivos, nervos, além de vasos linfáticos e sanguíneos. No córtex estão contidos os oócitos, circundado por células foliculares. Seu exterior é coberto por uma túnica fibrosa albugínea e epitélio superficial (HOPPER, 2015).

Com a função de transportar o oócito dos ovários até o espermatozoide e manter o zigoto nos primeiros estágios de desenvolvimento, o oviduto ou tuba uterina é caracterizado como um órgão tubular que se estende desde os cornos do útero até os ovários, medindo entre 20 e 30 cm de comprimento e 2 a 3 mm de diâmetro e é dividido em três segmentos: infundíbulo, istimo e ampola (BALL; PETER, 2004). Cada segmento possui características específicas na sua mucosa, o que define a sua função, como a fecundação na junção ampola- istimo (YANIZ et al., 2000).

O útero é um órgão muscular composto pelo corpo uterino, dois cornos e o cérvix. O tamanho do corpo uterino varia conforme idade e número de partos e apresenta aproximadamente 5cm de comprimento enquanto os cornos possuem entre 20 a 40 cm de comprimento externo. A parede uterina apresenta entre 3 e 10 mm de espessura e é constituída de 3 camadas: endométrio, miométrio e serosa (BALL; PETER, 2004). O endométrio é composto por um epitélio glandular e na sua mucosa contém estruturas não glandulares, responsáveis pela fixação da placenta, chamadas de carúnculas (SILVA MARQUES et al., 2007). A região do miométrio é constituída por camadas musculares, a interna mais espessa e a externa mais delgada. Já a serosa, é constituída por tecido conjuntivo (HOPPER, 2015).

A vagina, o vestíbulo e a vulva são órgãos associados a copulação. A vagina é um músculo membranoso disposto na cavidade pélvica posicionada entre o colo do útero até a

abertura da uretra. O vestíbulo é uma pequena área que inicia na abertura da uretra e termina na vulva. Já a vulva é a porção externa do trato reprodutivo sendo constituída pelos lábios vulvares e pela rima ou pudendo vulvar (KHATON et al., 2015).

2.2 Morfometria da genitália externa

A vulva é a porção final do trato genital tubular e é formada pelos lábios vulvares, que se unem conjuntamente nos ângulos dorsal e ventral. É a porção do trato feminino comum a ambos os sistemas, reprodutivo e urinário. O ângulo dorsal é arredondado, porém, o ventral é agudo (KONIG; LIEBICH, 2016). Esse último, situa-se aproximadamente 5 cm caudal e ventralmente a mesma distância ao nível do arco isquiático (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008). O clitóris, homólogo à glândula do pênis no macho, situa-se ventralmente a cerca de um centímetro no interior dos lábios.

A rima vulvar, também conhecida como fenda ou pudendo vulvar, é a abertura externa em forma de fenda vertical, ou seja, a fissura entre os grandes lábios. O tamanho da rima consiste no comprimento entre as comissuras dorsais e ventrais da fenda. A largura da vulva pode ser determinada pela distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus.

Considerando que o tamanho de estruturas do trato reprodutivo (ovários) pode influenciar a fertilidade das fêmeas (IRELAND et al., 2011; EBORN et al., 2013), recentes estudos objetivaram detectar possíveis associações entre o tamanho da genitália externa e a fertilidade de fêmeas bovinas da raça Tabapuã. Nesse estudo, a CFA foi maior em fêmeas com maiores rima e largura vulvares relativas ao tamanho corporal (MESQUITA et al., 2016). Em outro estudo, fêmeas de maior largura vulvar apresentaram menor intervalo de parto ($r=-0,210$; $P=0,0008$) e maior eficiência reprodutiva ($r=0,173$; $P=0,0544$), entretanto, não houve correlação com idade ao primeiro parto (IPP, $r=0,78$; MACULAN et al., 2018). Ainda nesse estudo, fêmeas da classe alta CFA (>50 folículos) possuíram maior ($P<0,02$) largura vulvar ($8,81\pm 0,12$ cm) em comparação com as fêmeas das classes intermediária ($8,42\pm 0,11$ cm) e baixa ($8,38\pm 0,13$ cm).

Alguns fatores podem influenciar o tamanho da genitália externa, dentre eles podemos citar o estado fisiológico (gestação), o período do ciclo reprodutivo e a genética das fêmeas. Segundo Streyll et al. (2011), no período de 12 horas que antecede o parto, é comum observar

edema vulvar. Entretanto, em casos incomuns, a presença do edema pode iniciar mais precocemente, podendo em casos extremos, aumentar cerca de 20 cm no período de 30 dias antes do parto (CHEONG; GILBERT, 2014). Nesse relato, no período pós-parto, a involução do edema ocorreu de forma rápida sendo que, após uma semana, a vulva apresentou tamanho normal. O edema pode perdurar por mais tempo dependendo do grau de invasão do parto. Manipulações obstétricas excessivas são as principais causas da incidência de edema vulvar persistente no pós-parto (CHEONG; GILBERT, 2014). A possível explicação para a incidência do edema vulvar no período pré-parto é o aumento nas concentrações circulantes de estradiol associado à uma diminuição das concentrações de progesterona (CHEONG; GILBERT, 2014). Segundo Hoffmann; Failing; Wehrend (2006), novilhas tendem a apresentar menor edema de vulva no período que antecede o parto em comparação com vacas.

Em fêmeas bovinas e em outras espécies, o edema vulvar é um sinal característico e normal do estro (cio). O inchaço estral, assim como o edema ocorrido no período do pré-parto, está associado à maiores concentrações de estradiol. Segundo Layek et al. (2011), o período em que o inchaço permanece durante o cio está em torno de $20,55 \pm 2,14$ horas. O aparecimento do edema vulvar no período do cio é correlacionado com a ovulação sendo que, segundo Layek, cerca de $31,05 \pm 2,98$ horas após a detecção do inchaço vulvar ocorreu a ovulação em fêmeas zebuínas. O grupo genético também tem influência sobre o edema vulvar sendo que, fêmeas cruzadas apresentam edema mais intenso (MADKAR et al., 2015).

Outro fator que pode afetar a morfometria da genitália externa é o escore de condição corporal (ECC). O ECC é um método subjetivo e prático para avaliação das reservas corporais do animal. Segundo Edmonson et al. (1989), os principais locais de deposição de gordura nos bovinos são utilizados para determinação do ECC. São eles: processos espinhosos e transversos das vértebras torácicas e lombares, tuberosidades ilíacas e isquiáticas, costelas e inserção da cauda. Animais muito condicionados ($ECC > 7$) podem apresentar deposição de gordura ao redor da vulva (NICHOLSON; BUTTERWORTH, 1986), entretanto, não foram encontrados dados na literatura para consolidar essa premissa. Considerando que o tamanho de quaisquer estruturas anatômicas podem ser influenciadas pelo tamanho corporal do indivíduo, em uma pesquisa prévia, estimou-se o volume corporal do animal através de medidas biométricas corporais (MACULAN et al., 2016). Após avaliação dos dados, foi constatado uma alta correlação ($r=0,91$; $P<0,0001$) entre o volume corporal estimado e peso. Desta forma, devido à praticidade da

medida, adotou-se o peso como sendo a medida adequada para padronização da mensuração vulvar pelo tamanho corporal, formando-se então, índices de largura vulvar relativas. Quando correlacionada com índices reprodutivos, a largura vulvar padrão, assim como a relativa, apresentaram correlação favorável com intervalo de parto ($r=-0,210$; $P=0,0008$; $r=-0,165$; $P=0,0087$, respectivamente) e eficiência reprodutiva ($r=0,173$; $P=0,0544$; $r=0,205$; $P=0,0224$, respectivamente).

2.3 Desenvolvimento, crescimento e maturação de oócitos em bovinos

2.3.1 Oogênese e foliculogênese

A oogênese é o processo de formação, crescimento e maturação do gameta feminino, transformando as células germinativas primordiais em folículos primordiais (BALL; PETER, 2004; HOPPER, 2015). Esse fenômeno tem início ainda no estágio embrionário quando células germinativas primordiais migram do intestino posterior até as cristas gonádicas, região precursora das gônadas, ocorrendo a proliferação por mitose e diferenciação dessas células em oogônias (BALL; PETER, 2004). Após a colonização, as células germinativas primordiais perdem a motilidade e a maior parte irá sofrer apoptose, definindo o número máximo de oócitos que a fêmea poderá possuir (DUKES; SWENSON; REECE, 1996).

Diniz et al. (2005) observaram o desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore e observaram a presença de 1331 células germinativas primordiais em embriões de 20mm (± 34 dias de gestação). A medida que a gônada foi se formando esse número aumentou para 6455 células em embriões de 25 a 30mm (± 40 dias), com diâmetro médio de $8,15\mu\text{m}$ e núcleo medindo $5,58\mu\text{m}$. Já as oogônias foram encontradas em fetos de 48 a 50mm (± 50 dias), cerca de 130.471 células, mediando $10,66\mu\text{m}$.

As oogônias sofrem divisão por meiose, transformando-se em oócitos que posteriormente são envolvidos por células da pré-granulosa, originando o folículo primário. Diniz et al. (2005) relataram que em fetos de 70mm (± 60 dias), as oogônias aumentam em número e diâmetro e começam a agrupar-se. A posterior fragmentação dessas oogônias origina os folículos primordiais. Vale ressaltar que na fase de prófase 1 da meiose, o oócito sofre um bloqueio, permanecendo neste estágio até a puberdade, onde os folículos serão selecionados para ovulação

e ocorrerá divisão meiótica, iniciando uma nova fase, a foliculogênese (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

Compreende-se como foliculogênese o processo pelo qual o folículo sofre mudanças morfológicas e funcionais devido a proliferação e diferenciação das células da parede folicular, sobre o efeito do sistema neuroendócrino, abrangendo desde a formação do folículo primordial até o estágio pré-ovulatório (STAIGMILLER; ENGLAND, 1982; PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

A primeira fase folicular, o folículo primordial, refere-se ao ovócito quiescente na fase de prófase I da meiose (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Este folículo é composto por células achatadas da granulosa apresentando um diâmetro de aproximadamente 33 μ m (SANTOS et al., 2013; TEH et al., 2018) e a sua formação é visualizada em fetos de 140 a 150mm, aproximadamente 85 dias de idade gestacional (DINIZ et al., 2005).

A medida que o desenvolvimento fetal vai acelerando, a quantidade de folículos primordiais é reduzida no ovário. Santos et al. (2013) quantificaram os folículos nos ovários de fetos de *Bos taurus indicus* em diferentes estágios de desenvolvimento e observaram que, aos 3 meses, a população folicular era em média de 35,8%, enquanto que aos 7 meses, esse número foi reduzido a 16,9%. Essa redução ocorre devido a evolução dos folículos para os outros estágios de desenvolvimento, assim como em função da apoptose.

O folículo primordial pode permanecer nesse estágio de desenvolvimento, morrer por atresia ou ser transformado em folículo primário e a sua ativação pode ocorrer instantaneamente ou até após anos da sua formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), por meio de estímulos hormonais. Esse fenômeno é inibido pela ação da progesterona e estradiol e estimulado pela ação do FSH. Histologicamente, essas células se diferenciam na estrutura das células da granulosa, apresentando forma cuboide, um indicativo de ativação (KEZELE; SKINNER, 2003).

Seguindo o desenvolvimento dos folículos, as células da granulosa que os rodeiam aumentam de tamanho e número de camadas, formando o folículo secundário ou pré antral. Nesta fase, o folículo e o oócito apresentam diâmetro médio de 77,2 μ m e 8,0 μ m, respectivamente (SANTOS et al., 2013). Teh et al. (2018) caracterizaram as células da granulosa em células de diferentes estágios da foliculogênese em bovinos e observaram que os folículos secundários são compostos entre 2 e 10 camadas de células granulocíticas de forma cuboide, além de identificar células da teca e a zona pelúcida. As células da teca estão localizadas no estroma interfolicular e

contém em sua estrutura mitocôndrias, retículo endoplasmático agranular, vesícula lipídica e uma importante função desta célula é secreção de hormônios esteroides (MAGOFFIN, 2005). A zona pelúcida é uma membrana extracelular de glicoproteínas que envolve o oócito e desempenha papel crucial na oogênese, fertilização, pré-implantação e desenvolvimento do ovócito, além de regular a ligação do espermatozoide ao ovócito através de receptores espécie específicos. Essa membrana induz o espermatozoide a se submeter à exocitose celular, participa no bloqueio da polispermia após a fertilização e protege os embriões (BOCCACCIO et al., 2012).

O folículo terciário, ou antral é caracterizado pela presença de multicamada de células em torno do oócito e de uma cavidade contendo líquido folicular chamado de antro (DUMESIC et al., 2015). O fluido antral surge em folículos contendo 200 a 3000 células, medindo de 15 a 400µm através da transudação dos capilares das células da teca, sendo constituído por hormônios como estrógeno, progesterona e inibina, entretanto, a sua composição é variável, assim como a quantidade, dependendo do desenvolvimento do folículo (GOSDEN et al., 1988).

Além da presença do antro, nos folículos antrais observa-se o núcleo excêntrico, presença de mitocôndrias redondas e alongadas, gotículas e vesículas de lipídeos e complexos de Golgi em todo o ooplasma (FAIR et al., 1997). Na fase pré-ovulatória, os folículos são circundados por várias camadas de células do *cumulus oophorus* e ocorre o espessamento das camadas internas e externas da teca (TEH et al., 2018). Nesta fase, os folículos são dependentes de FSH e um grupo é recrutado, porém, somente um folículo é selecionado e adquire capacidade ovulatória, enquanto os folículos subordinados entram em atresia (DRIANCOURT, 2001).

2.3.2 Controle hormonal do desenvolvimento folicular

O hipotálamo é um importante regulador do desenvolvimento folicular pois secreta o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que atua regulando a liberação dos principais hormônios reprodutivos pela hipófise, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (BALL; PETER, 2004).

Na fase pré antral, o folículo é considerado independente de gonadotropinas pois pode se desenvolver com concentrações mínimas, entretanto, estudos sugerem que esses hormônios influenciam fortemente o desenvolvimento folicular. Adriaens; Cortvrindt; Smitz (2004) observaram uma forte relação entre o período de exposição do folículo ao FSH e a formação do

antro, evidenciando que os folículos que não foram expostos a esse hormônio tiveram uma limitação no crescimento das células da granulosa, permanecendo na fase pré antral. Saraiva et al. (2012) observaram a expressão de RNAm do receptor de FSH em folículos primários, secundários e antrais em ovários de cabra. O FSH atua na formação de receptores de LH pela célula da teca do folículo. Saraiva et al. (2012) ao estudarem a influência dos hormônios FSH e LH no desenvolvimento de folículos pré-antrais de cabra cultivados *in vitro* concluíram que o FSH aumenta os níveis do RNAm do receptor de LH, assegurando um efeito sinérgico de ambas gonadotrofinas no crescimento folicular e retomada do desenvolvimento meiótico.

Com funções múltiplas no desenvolvimento folicular, a elevação nas concentrações plasmáticas de FSH é responsável pela onda folicular, recrutando o folículo dominante (GUPTA et al., 2014), que desempenha um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina. Sobre esta influência ocorre a redução dos níveis circulante de FSH e aumento do LH (DRIANCOURT, 2001), culminando no período pré-ovulatório.

2.4 Hormônio anti-Mülleriano (AMH) em fêmeas

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é uma glicoproteína dímera com 140 Kd, constituída de dois dímeros de 70 Kd ligados por pontes dissulfídicas, cuja região carboxi-terminal (C-terminal) mostra homologia com a superfamília dos fatores de crescimento e transformação do tipo beta (TGF- β ; PEPINSKY et al., 1988). Após clivagem proteolítica, é produzido um fragmento inativo de 110 kd e outro, biologicamente ativo, de 25 kd na região C-terminal (GIULI et al., 1997). De acordo com a espécie, o gene codificante para AMH localiza-se em um determinado cromossomo sendo que, em seres humanos está presente no cromossomo 19 (COHEN-HAGUENAUER et al., 1987) e em equinos e bovinos no cromossomo 7 (GAO & WOMACK, 1997).

O mecanismo de ação do AMH é mediado por duas classes de receptores de membrana, serina/treonina/kinases tipo I e II. Os receptores do tipo I são compartilhados com outros membros da superfamília como as BMP's (*bone morphogenetic protein*) e seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado. Já os receptores do tipo II, contrariamente à maioria dos membros da família TGF- β , os quais possuem diversos órgãos-alvo e múltiplas funções, são expressos apenas nos órgãos-alvo do AMH, ou seja, nos órgãos reprodutivos, como células

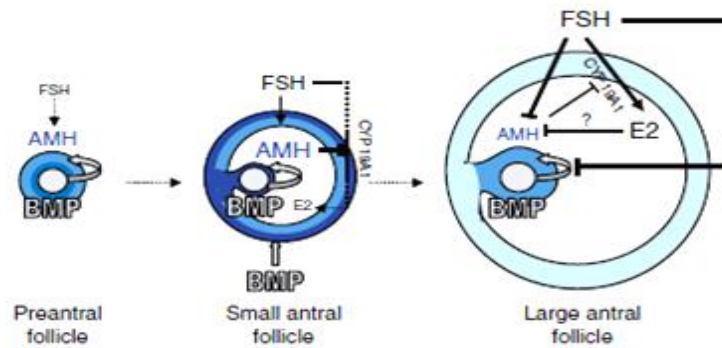
mesenquimais que circundam os ductos de Müller durante o período de regressão e nas gônadas de ambos os sexos (BAARENDS et al., 1995; Di CLEMENTE et al., 1994; ROCHA et al., 2013). Entretanto, apesar de não se conhecer a função dos receptores do tipo I, faz-se necessário a sua fosforilação para que ocorra a sinalização pós-receptor (DOMENICE et al., 2002). O receptor tipo II do AMH em humanos consiste em uma proteína de 573 aminoácidos, gene de 8,2 Kb localizado no braço longo do cromossomo 12 e está arranjado em 11 éxons (éxons 1-3 codificam o domínio extracelular, e o éxon 4, o segmento transmembrana) (Di CLEMENTE et al., 1994; JOSSO et al., 1997) Em bovinos, a proteína AMH é composta por 575 aminoácidos (CATE et al., 1986).

O AMH é expresso em todos os mamíferos, independentemente do gênero, entretanto, suas funções são diferentes, porém, relacionadas com o desempenho reprodutivo em ambos os sexos. Em fêmeas, o AMH é produzido pelas células da granulosa de pequenos folículos em crescimento (pré-antrais) de várias espécies mamíferas (DURLINGER; VISSER; THEMEN, 2002; RICO et al., 2011; VAN ROOIJ et al., 2005). Durante a diferenciação sexual feminina, o AMH não é expresso no ovário, o que garante uma evolução normal do trato reprodutivo feminino (MUNSTERBERG; LOVELL-BADGE, 1991; TAKETO et al., 1993). Contrariamente à produção de AMH em machos, durante a fase fetal, as células da granulosa exibem ligeira imunorreatividade somente quando os folículos estão em estágio mais avançado de desenvolvimento e apenas produzirão pequenas quantidades de AMH nas células da granulosa após o nascimento (BÉZARD et al., 1987). Folículos primários, secundários e antrais iniciais parecem ser os que expressam maior concentração de AMH (TAKETO et al., 1993; WEENEN et al., 2004; BÉZARD et al., 1987; DURLINGER et al., 2002). O posicionamento das células da granulosa influencia a produção de AMH sendo que, as células localizadas ao redor do oócito e do antro, expressam maiores quantidades (UENO et al., 1989; HIROBE et al., 1992, 1994; BAARENDS et al., 1995).

A principal função do AMH nas fêmeas é promover um efeito inibidor no recrutamento de folículos primordiais por diminuição da sensibilidade ao FSH (DURLINGER et al., 1999; MONNIAUX et al., 2013). Essa inibição do recrutamento folicular ocorre através do bloqueio da síntese e atividade da P450 aromatase nas células da granulosa, exercendo um feedback negativo no desenvolvimento folicular e na proliferação das células da granulosa (JOSSO; Di CLEMENTE; GOUEDARD, 2001; TAKAHASHI; KOIDE; DONAHOE, 1986) além de

promover uma redução na expressão de mRNA do receptor de FSH (PELLATT et al., 2011) diminuindo a capacidade de resposta dos folículos (Figura 1). Estudos comprovaram que a concentração de AMH no fluido folicular é maior em folículos antrais iniciais em comparação com folículos em fases mais avançadas de desenvolvimento (ANDERSEN; BYSKOV, 2006; FANCHIN et al., 2007; TAKAHASHI; KOIDE; DONAHOE, 1986).

Figura 1 - Ações do AMH sobre a foliculogênese.



Fonte: Adaptado de Monniaux et al., 2013.

Na medicina humana e animal, a concentração de AMH vem sendo utilizada para detectar tumores de células de Sertoli e/ou granulosa. El-Sheik et al. (2013) investigaram a possibilidade de detecção de tumores de células da granulosa e da teca em bovinos através da mensuração da concentração de AMH e concluíram que este é um biomarcador confiável e sensível para este tipo de tumor.

A atuação do AMH em fêmeas mamíferas é bem elucidada e caracterizada como um indicador da reserva folicular ovariana (IRELAND et al., 2008; RICO et al., 2009; BATISTA et al., 2014). Sabe-se que a população folicular ovariana é finita e definida na fase fetal em espécies mamíferas. Essa população é amplamente variável entre e dentre espécies mamíferas sendo que a variação individual pode refletir no potencial reprodutivo das fêmeas e no processo de seleção para superioridade reprodutiva. Em bovinos, estimasse que ao nascimento, a população folicular seja em torno 130.000 apresentando uma ampla variação individual (ERICKSON, 1966a, 1966b)

O AMH possui papel de marcador indicando o número de folículos que fizeram a transição do *pool* de folículos primordiais para folículos em crescimento, fase esta em que o desenvolvimento ocorre independente de gonadotrofinas. Assim, esse fator liberado por folículos

em crescimento irá refletir a quantidade de folículos primordiais quiescentes (DURLINGER et al., 2002). O número de folículos antrais é fortemente correlacionado com o número de folículos pré-antrais (CUSHMAN et al., 1999) e devido à praticidade para avaliação (ultrassonografia), utiliza-se a contagem folicular antral (CFA) como preditor da reserva folicular ovariana. A CFA é positivamente associado com mensurações indiretas de fertilidade como a funcionalidade ovariana (IRELAND et al., 2008, 2009; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009), resposta a protocolos de superovulação (CUSHMAN et al., 1999; SINGH et al., 2004; RICO et al., 2009; MONNIAUX et al., 2010), preditor da performance na PIVE em *Bos taurus* (VERNUNFT et al., 2015) e *Bos indicus* (GUERREIRO et al., 2014), marcador de fertilidade (OLIVEIRA et al., 2002; MOSSA et al., 2012) e longevidade reprodutiva (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2015; MODINA et al., 2014).

Sabendo que a concentração de AMH é correlacionada com a CFA (IRELAND et al., 2010; BATISTA et al., 2014; RICO et al., 2009; SOUZA et al., 2016), torna-se possível a detecção de animais com alto potencial reprodutivo através da dosagem do AMH. A relação entre AMH e CFA parece ser constante entre os diferentes grupos genéticos de bovinos, entretanto, os valores (concentração de AMH e CFA) são bem variáveis.

Uma grande vantagem do AMH como marcador de fertilidade é que sua concentração varia minimamente ao longo do ciclo estral sendo, portanto, uma única amostra sanguínea, independente da fase do ciclo reprodutivo, suficiente para prever a reserva folicular ovariana (RICO et al., 2009; IRELAND et al., 2010; SOUZA et al., 2015). Independente do grupo genético (*Bos taurus* e *Bos indicus*), fêmeas com maior concentração de AMH obtiveram maior número de folículos aspirados, complexos cumulus oócitos recuperados e maior número de embriões produzidos (GUERREIRO et al., 2014). Diversos estudos observaram uma associação forte e positiva entre a concentração de AMH e a produção *in vivo* de embriões após protocolo de superovulação em bovinos de leite (MONNIAUX et al., 2010; RICO et al., 2011; SOUZA et al., 2015).

Outra possível vantagem da utilização do AMH como marcador da reserva folicular ovariana é a possibilidade de detecção em animais jovens, antes de entrarem em idade reprodutiva. Considerando que, a CFA em bezerras torna-se inaplicável devido à dificuldade da utilização do aparelho de ultrassom, a detecção da reserva folicular via dosagem hormonal pode acelerar o processo de seleção animal por diminuir o intervalo entre gerações (CAMARGO et al.,

2005). Não parecem existir dúvidas sobre a positiva relação entre a concentração de AMH e o sucesso de técnicas reprodutivas, entretanto, a relação entre AMH e a reprodução a campo ainda não é bem elucidada.

Ribeiro et al. (2014) obtiveram relação benéfica em vacas entre a concentração de AMH e taxa de concepção ao primeiro serviço e perda embrionária entre os 30 e 65 dias de gestação. No mesmo estudo, a concentração de AMH foi relacionada negativamente com o número de prenhez/inseminação somente quando a detecção de cio foi realizada. Quando a ovulação foi sincronizada para IATF, essa mesma relação com o AMH não foi observada.

Santos et al. (2014) não detectaram relação entre a concentração de AMH e a taxa de concepção em protocolos de IATF em vacas Nelore. Além disso, não se observou efeito da população folicular antral de doadoras no estabelecimento da prenhez após a transferência dos embriões produzidos (BRAGANÇA et al., 2014). Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, não observamos associação entre a concentração de AMH e índices reprodutivos (idade ao primeiro parto, intervalo de partos) em vacas e novilhas da raça Tabapuã (n=591; MACULAN et al., 2018)

2.5 Contagem folicular antral (CFA)

A população folicular ovariana em mamíferos é finita e definida durante a fase fetal. Essa população é amplamente variável entre e dentro espécies mamíferas (ERICKSON, 1966a, 1966b) sendo que, a variação individual pode refletir no potencial reprodutivo das fêmeas e no processo de seleção para superioridade reprodutiva. O número de folículos primordiais ao nascimento é muito variável entre indivíduos (ERICKSON, 1966a), porém, é correlacionado com o número de folículos antrais em bovinos (CUSHMAN et al., 1999). Já foi demonstrado que o número de pequenos folículos antrais (2 a 5 mm) é altamente correlacionado ($r=0,95$; $P<0,0001$) com o número de folículos antrais maiores (5 a 10 mm; BANCSI et al., 2002). Da mesma forma, Ireland et al. (2008) demonstraram que o número de folículos primordiais está correlacionado com o número de folículos antrais. Sendo assim, a contagem dos folículos antrais identificáveis ao exame ultrassonográfico (2 a 10 mm) é o método mais prático para avaliação da reserva folicular ovariana (BANCSI et al., 2002).

A CFA via ultrassonografia pode ser um indicador de alta fertilidade (OLIVEIRA et al., 2002), baixos intervalos de partos (IDP; OLIVEIRA et al., 2002), maior longevidade reprodutiva (CUSHMAN et al., 2009; MODINA et al., 2014) e melhor resposta a protocolos de superovulação (SINGH et al., 2004).

Um dos principais fatores que influenciam a contagem folicular antral é a genética das fêmeas. A maioria dos estudos demonstram que fêmeas *Bos indicus* possuem maior CFA em comparação às *Bos taurus*. Segundo Alvarez et al. (2000), vacas da raça Brahman possuem maior CFA que vacas da raça Senepol. Batista et al. (2014) observaram variações na CFA em novilhas Nelore entre 18 a 85 folículos enquanto nas Holandesas, essa variação foi de 8 a 51. A classificação dos animais de acordo com a CFA segundo Ireland et al. (2008) e Burns et al. (2005), consideram fêmeas de alta contagem quando possuem mais de 25 folículos em ambos ovários, média entre 15 a 25 e baixa menor que 15. No entanto, considerando as diferenças na fisiologia reprodutivas dos grupos genéticos taurus e indicus, a classificação de fêmeas zebuínas deve ser baseada na distribuição de frequência das contagens observadas. Em um estudo que visava a classificação das fêmeas em grupos de acordo com a CFA, Rodrigues et al. (2015) considerou que na raça Nelore, essa classificação deveria ser diferente da descrita por Ireland et al. (2008) e Burns et al. (2005). Foram classificadas como de baixa CFA as fêmeas que possuíam ≤ 32 folículos, média entre 32 e 48 e alta ≥ 48 .

Fêmeas zebuínas submetidas à protocolo de superovulação possuem melhor performance que taurinas. Esse resultado deve-se ao maior número de folículos aspirados que desencadeia em melhor sucesso das biotécnicas reprodutivas (SILVA-SANTOS et al., 2011; WATANABE et al., 1999). O número de oócitos recuperados por aspiração folicular pode ser 3 a 4 vezes maior em fêmeas zebuínas comparadas com taurinas (VIANA et al., 2000). Segundo Scheetz et al. (2012), células da granulosa de fêmeas com baixa CFA tiveram capacidade diminuída de responder à ação FSH, mostrando a baixa capacidade de resposta ovariana à estimulação de gonadotrofina em fêmeas *B. taurus* de corte e de leite. Estas observações potencialmente explicam porque fêmeas com baixo CFA respondem fracamente à estimulação de gonadotrofina (IRELAND et al., 2007), apesar do número significativo de folículos remanescentes relativos na reserva ovariana (IRELAND et al., 2008). De acordo com os resultados encontrados na literatura, fêmeas *Bos taurus* possuem menor CFA. Entretanto, esse fato não pode ser explicado pela presença de menor

número de folículos primordiais tendo em vista que esse número é semelhante em *Bos taurus* e *Bos indicus* (IRELAND et al., 2008).

Silva-Santos et al. (2011) demonstraram histologicamente que fetos, novilhas e vacas da raça Angus não apresentam maior número de folículos pré-antrais em relação aos animais da raça Nelore, porém, a CFA desta última é maior. Esse fato pode ser explicado pela concentração sérica do Hormônio anti-Mülleriano (AMH) que está relacionado à atresia folicular e este é maior em fêmeas Nelore em relação às Holandesas (BATISTA et al., 2014). O AMH inibe a produção e a sensibilidade folicular ao FSH (IRELAND et al., 2009). Em fêmeas da raça Nelore, apesar de não possuírem maior número de folículos pré-antrais, a maior concentração de AMH pode diminuir a atresia folicular aumentando assim o número de folículos que chegam ao desenvolvimento final.

A CFA está relacionada às várias mensurações de fertilidade sendo melhores resultados observados em biotécnicas reprodutivas. A influência do AMH na reprodução a campo ainda não é elucidada. Na produção in vitro de embriões (PIVE), estudos demonstram que a maior CFA foi relacionada com maior número de embriões produzidos (IRELAND et al., 2007). Santos (2013) concluíram que vacas Nelore com alta CFA obtiveram maior número de oócitos viáveis, maiores taxas de clivagem, blastocistos e proporção de embriões vitrificáveis em comparação com fêmeas de CFA intermediária e baixa. Além do grupo genético, outros fatores podem influenciar a CFA como por exemplo, o tamanho ovariano.

O tamanho de estruturas reprodutivas pode influenciar a CFA. Ireland et al. (2011) demonstraram que fêmeas da raça Holandesa que possuíram maior volume ovariano apresentaram maior número de folículos antrais sendo dados semelhantes reportados por Eborn et al. (2013) em novilhas Angus. Entretanto, Maculan et al. (2018) não observaram diferenças entre a CFA de fêmeas com diferentes tamanhos ovarianos. Segundo McNeel et al. (2017), novilhas *Bos taurus* que possuíram maior tamanho uterino obtiveram maiores CFA's. O tamanho da rima e da largura vulvar relativos ao tamanho corporal das fêmeas foi indicativo de maiores CFA's em vacas Tabapuã (MESQUITA et al., 2016). Corroborando com estes dados, Maculan et al. (2018) observaram que fêmeas Tabapuã classificadas com alta CFA (>50) possuíram maior largura vulvar em comparação com as da classe média (≥ 28 e ≤ 50) e baixa (<28). Como a CFA reflete a reserva dos folículos ovarianos, pode-se prever que a idade influencia negativamente a CFA (BURNS et al., 2005; CUSHMAN et al., 2009). Sendo assim, a CFA de novilhas pode ser um

indicativo mais inequívoco de maior fertilidade para predizer o futuro potencial reprodutivo. Em fêmeas Tabapuã (n=591) com idades superiores à 14 anos, a CFA mostrou inferior quando comparada às fêmeas mais jovens (MACULAN et al., 2018). Diferentemente da idade, a fase do ciclo estral parece não ter influência sobre a CFA (CUSHMAN et al., 2009). Alvarez et al. (2000) verificaram que a CFA avaliada em fases aleatórias do ciclo estral individualmente em vacas de corte tem influência mínima no número total de folículos. Em relação ao estágio reprodutivo, Maculan et al. (2018) não observaram diferenças ($P=0,71$) entre a CFA em fêmeas nulíparas ($38,6\pm 23,96$), primíparas ($47,54\pm 26,16$) e múltiparas ($41,08\pm 25,54$). Ainda neste estudo, a CFA foi negativamente correlacionada ($r=-0,17$; $P<0,001$) com a idade ao primeiro parto, de tal forma que, quanto menor a idade ao primeiro parto, maior a CFA.

Não parece haver dúvidas sobre o desempenho reprodutivo *in vitro* superior de fêmeas com maior CFA. Entretanto, na reprodução a campo, os resultados ainda não são consolidados. Alvarez et al. (2000) verificaram que a baixa CFA foi associada com redução da taxa de prenhez em novilhas devido à baixa competência de produção de embriões. Segundo Oliveira et al. (2002), vacas que apresentam maior CFA possuem menor intervalo de parto. Resultados similares relacionados à fertilidade também foram encontrados por Cushman et al. (2009) em que novilhas mestiças com alta CFA (≥ 25) possuíram maior taxa de prenhez que as de baixa (≤ 15) ($94,3\pm 2,3$ vs. $85,5\pm 3,4$, respectivamente). Em fêmeas Tabapuã (n=591), a maior contagem folicular antral foi correlacionada ($r= -0,17$; $P=0,006$) com menores intervalos de partos (MACULAN et al., 2018). Contrariamente aos autores citados acima, Rodrigues et al. (2013) não observaram diferenças nas taxas de concepção de fêmeas da raça Nelore submetidas à protocolo de Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) de acordo com a CFA. Em um estudo recente com vacas Nelore, não houve diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de concepção entre vacas com baixa, intermediária e alta CFA (58,6; 48,6 e 51,9%, respectivamente (SANTOS et al., 2016).

Dados sobre longevidade reprodutiva foram avaliados por Modina et al. (2014), em vacas leiteiras de alta produção. Nesse estudo, vacas descartadas por baixa fertilidade foram caracterizadas histologicamente por senescência ovariana prematura quando comparadas a vacas de mesma idade descartadas por outros motivos. Em um estudo desenvolvido por Su et al. (2012), vacas velhas (≥ 15 anos) obtiveram pior competência no desenvolvimento de oócitos

recuperados através de folículos antrais por OPU durante o desenvolvimento folicular quando comparada com vacas jovens (12 meses) e de meia-idade (7-8 anos).

Sabendo que as características reprodutivas são fortemente influenciadas por fatores não genéticos, é de se esperar que a herdabilidade das características relacionadas à reprodução seja baixa. A herdabilidade de índices reprodutivos como intervalo de parto, intervalo parto ao primeiro cio, incidência de cistos, abortos e retenção de placenta está entre 0,04 e 0,16 (PATERSON; CORAH, 1992; SPLAN; CUNDIFF; VAN FLECK, 1998). Na característica contagem folicular antral, trabalhos apontam herdabilidade moderada à baixa. Walsh et al. (2014) avaliaram dois rebanhos leiteiros com o intuito de avaliar a herdabilidade da CFA. Em novilhas leiteiras de um rebanho nos EUA, a herdabilidade para a CFA (\pm SE) foi de $0,25 \pm 0,13$ enquanto no rebanho Irlandês, a herdabilidade foi de $0,31 \pm 0,14$. Entretanto, em um relato de Snelling et al. (2012), a herdabilidade para a CFA em rebanho de corte foi de 0,73.

2.6 Fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*) e taurinas (*Bos taurus taurus*)

O gênero *Bos* abriga diferentes espécies de bovídeos dentre eles o bovino domesticado *Bos taurus* e as suas principais subespécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, referindo-se ao gado europeu e ao indiano, respectivamente. Essas subespécies são descendentes do *Bos primigenius* e apresentam distinções morfológicas e fisiológicas, tanto a nível fenotípico quando a nível celular (HIENDLEDER; LEWALSKI; JANKE 2008).

Estudos relatando a influência do grupo genético sobre a morfometria da genitália externa escassos na literatura. De acordo com dados preliminares do estudo em questão, fêmeas *Bos indicus* possuem maior largura vulvar que *Bos taurus* ($P=0,0007$). A largura vulvar (mm) em fêmeas das Raças Brahman ($n=78$), Angus ($n=19$) e Simental ($n=85$) foram, respectivamente $111,45 \pm 1,45$; $76,88 \pm 2,89$; $72,38 \pm 1,38$. Em um recente estudo, a largura vulvar de vacas da raça Tabapuã ($n=48$) foi de aproximadamente 5 a 7,5 cm (MESQUITA et al., 2016).

Com o objetivo de verificar as diferenças na população de folículos em fetos, novilhas e vacas de *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* Silva-Santos et al. (2011) quantificaram, por meio de cortes histológicos, a população de folículos pré antrais e encontraram valores para *Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus* de $143,929 \pm 64,028$ vs. $285,155 \pm 325,195$ em fetos, 76,851

$\pm 78,605$ vs. $109,673 \pm 86,078$ para novilhas e $39,438 \pm 31,017$ vs. $89,577 \pm 86,315$ em vacas. Apesar das diferenças entre as subespécies, esses pesquisadores concluíram que o maior número de ovócitos de fêmeas *Bos indicus* pode ser relacionado a mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular após a fase pré-antral.

Diferenças na dinâmica folicular entre *B. indicus* e *B. taurus* foram observadas por Carvalho et al. (2008). Vacas *B. indicus* possuem mais ondas foliculares, maior número de folículos, recrutam maior número de folículos por onda folicular ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$) em comparação com as *B. taurus*, entretanto, quanto ao diâmetro do folículo ovulatório, fêmeas de *B. taurus* apresentam folículos maiores em valores absolutos ($12,1 \pm 0,5$) quando comparados a *B. indicus* ($11 \pm 0,8$). Resultados semelhantes foram observados por Castilho et al. (2007) ao mensurarem o diâmetro do folículo dominante de pós púberes *B. indicus* (10-13 mm) quando comparadas a *B. taurus* (16-20mm) (IRELAND et al., 2000).

As diferenças reprodutivas entre as subespécies bovídeas se relacionam a diferenças fisiológicas, como variações na circulação de insulina e IGF-1 (ALVAREZ et al., 2000). Batista et al. (2014) avaliaram os níveis plasmáticos de hormônio anti-Mülleriano (AMH) de novilhas *B. indicus* (Nelore) e *B. taurus* e correlacionaram com o número de folículos antrais. Esses pesquisadores encontraram em fêmeas nelore maior número de folículos antrais assim como maior concentração de AMH. Resultados semelhantes foram observados por Guereiro et al. (2014) correlacionando positivamente o número de folículos com os níveis plasmáticos de AMH. Silva-Santos et al. (2011) e Batista et al. (2014) observaram que fêmeas *Bos indicus*, apesar de possuírem um maior número de folículos antrais e maior concentração de AMH circulante possuíram um menor número de folículos primordiais quando comparados com fêmeas *Bos taurus*, comprovando a ação do AMH na diminuição das taxas de atresia folicular evitando assim o esgotamento prematuro da população folicular ovariana. Pode-se considerar que uma das funções do AMH nos folículos ovarianos seja a de inibir a meiose do oócito impedindo assim o recrutamento folicular e a alta incidência de atresia folicular (TAKAHASHI et al., 2008).

Stojšin-Carter et al. (2016) avaliaram os níveis de hormônio anti-Mülleriano no plasma, no fluido folicular e a transcrição nas células da granulosa e suas relações com parâmetros reprodutivos em *B. indicus* e *B. taurus*. Foram observados maiores valores de AMH plasmático em animais zebu ($0,77 \pm 0,99$) e mestiços ($0,63 \pm 0,07$) quando comparados aos europeus ($0,33 \pm 0,24$), como também o AMH do fluido folicular em fêmeas zebuínas ($4934,3 \pm 568,5$) e

taurinas ($2977,9 \pm 214,1$ ng / mL), entretanto, não foram observadas diferenças na expressão do mRNA do AMH na célula da granulosa em ambas as espécies.

2.7 Anatomia do sistema reprodutor de machos bovinos

Anatomicamente, o sistema reprodutor do touro é intimamente ligado ao sistema urinário sendo constituído pelos seguintes órgãos: testículos e escroto, epidídimos, ductos deferentes, glândulas acessórias (ampolas, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e próstata), pênis e prepúcio (AMMAN; SCHANBACHER, 1983; FRANDSON, 1979).

Os testículos são contidos no escroto e ficam localizados verticalmente na região inguinal. Têm formato oval e alongado medindo em média 10 a 12 centímetros de comprimento, 6 a 8 centímetros de largura e pesando aproximadamente 300 gramas (SISSON, 1996). A maior parte da sua superfície é coberta pela túnica vaginal. Logo abaixo dessa túnica está a túnica albugínea, que é delgada e composta por fibras elásticas e desprovida de musculatura lisa. Da face profunda da túnica albugínea, partem trabéculas e septos que se deslocam para o interior da glândula, subdividindo-a em lóbulos. Nesses lóbulos são encontrados os túbulos seminíferos, onde são originados os espermatozoides (SISSON, 1996).

Os testículos possuem duas funções primordiais: espermatogênese, que dura aproximadamente 61 dias em bovinos; e produção hormonal, produzindo principalmente a testosterona, hormônio sexual masculino, bem como estrógeno, progesterona e colesterol (EWING; BROWN, 1977). Estas duas funções ocorrem respectivamente nos túbulos seminíferos, revestidos por células de Sertoli e de Leydig. A produção de espermatozoides e a secreção de esteróides são dependentes das ações separadas de duas gonadotrofinas; hormônio foliculo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Apesar disso, ambos os processos estão intimamente atrelados, pois níveis adequados de testosterona são essenciais para a produção e maturação normal dos espermatozoides (AMMAN; SCHANBACHER, 1983).

O escroto envolve os testículos e é caracterizado como uma estrutura fina, porém altamente vascularizada. A túnica dartos, localizada abaixo da pele escrotal, é uma camada fibroelástica que se associa com a túnica vaginal e ao ligamento escrotal. Esse ligamento é o responsável por unir a túnica vaginal ao escroto e também por prender a cauda epididimal ao

testículo. O escroto é dividido em duas metades por um septo, que é uma extensão da túnica dartos, responsável por separar os dois testículos.

O epidídimo é um ducto único, que liga a rede mediastínica testicular ao canal deferente. É dividido em cabeça, corpo e cauda, sendo que a cabeça é longa e está posicionada sobre a extremidade dorsal do testículo. O corpo é estreito e está situado na borda caudal do testículo, onde sua inserção ocorre por uma delgada prega peritoneal. A cauda é grande e proeminente e encontra-se inserida ventral e caudalmente ao testículo (FAYRER-HOSKEN, 1997; SISSON, 1996). As funções do epidídimo são setoriais; a cabeça e o corpo atuam no transporte e maturação dos espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos, enquanto a cauda serve como reservatório dos espermatozoides maduros (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os ductos deferentes são a continuação do sistema de ductos que vai da cauda do epidídimo até a uretra pélvica e funcionam como canais de passagem para os espermatozoides. Ao final destes ductos encontram-se as ampolas deferentes, uma dilatação dos ductos deferentes que estão posicionadas entre as vesículas seminais (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As vesículas seminais normalmente possuem de 8 a 15 cm de comprimento e de 2 a 4 cm de diâmetro, porém, podem variar de acordo com a idade e estado de saúde dos animais. São glândulas multilobuladas que se posicionam anatomicamente de forma lateral ao pênis intrapélvico e de forma cranial à próstata. A próstata é uma glândula arredondada, localizada no final da uretra pélvica enquanto as glândulas bulbouretrais localizam-se na parte dorsal do pênis, próximo ao arco isquiático (FAYRER-HOSKEN, 1997). As glândulas vesiculares, prostática e bulbouretrais possuem a função de produzir o plasma seminal que será o veículo que conduzirá os espermatozoides para o sistema reprodutor feminino. A produção desse plasma é a responsável pelo volume que será ejaculado pelo bovino (ANDERSON, 1945).

O pênis é o órgão responsável pela cópula e em touros adultos tem em média um metro de comprimento. Possui característica fibroelástica e estruturalmente possui dois corpos cavernosos, um corpo esponjoso e uma glândula. Em touros apresenta ainda uma estrutura denominada de flexura sigmóide, localizada dorsal e caudalmente ao escroto. Essa flexura representa cerca de um quarto da extensão peniana e é distendida durante a ereção (FAYRER-HOSKEN, 1997; KONIG; LIEBICH, 2016).

Bovinos possuem uma glândula que tem entre 10 e 12 centímetros e é achatada dorso-ventralmente. Sua extremidade é pontiaguda e levemente espiralada, onde situa-se o óstio uretral

externo. É coberta por tecido mole, que forma o bulbo da glândula e é altamente inervada (KONIG; LIEBICH, 2016).

2.8 Espermatogênese

A puberdade é o resultado de um ajuste gradual entre a habilidade das gônadas de assumir de forma simultânea, a gametogênese e a esteroidogênese, e o crescimento da atividade gonadotrófica. Os níveis de testosterona aumentam progressivamente até a fase adulta em resposta à secreção das gonadotrofinas. A puberdade do macho bovino é alcançada quando este apresenta o comportamento sexual e a capacidade de produzir gametas, sendo o espermatozoide o produto final da gametogênese masculina (BANKS, 1992).

O processo de formação dos espermatozoides, denominado de espermatogênese, ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. O lúmen desses túbulos é revestido por células de Sertoli. Essas células fornecem um microambiente adequado para o desenvolvimento de células germinativas e desempenham papel fundamental no controle hormonal durante o processo de espermatogênese. As células de Sertoli sofrem ação direta do FSH e em resposta à estimulação desse hormônio secretam fluídos e produtos específicos como a proteína de ligação ao andrógeno (PLA) e a inibina. A PLA age atenuando as mudanças de concentração da testosterona nos túbulos, enquanto a inibina atua no sistema de feedback negativo estimulando a hipófise anterior a suprimir a produção do FSH (AMMAN; SCHANBACHER, 1983).

A espermatogênese acontece por meio de divisão e diferenciação celular e tem uma longa jornada cronológica. Em bovinos, o processo dura em média 61 dias e é dividido em três fases principais; espermatocitogênese, meiose e espermiogênese sendo estas caracterizadas pela divisão e/ou diferenciação das espermatogônias, dos espermatócitos e das espermátides, respectivamente (JOHNSON et al., 2000).

Inicialmente as espermatogônias, células germinativas masculinas, sofrem divisão mitótica. Algumas das espermatogônias originadas desse processo mitótico são armazenadas para manter o estoque de células progenitoras, enquanto outras sofrem mutação e transformam-se nos espermatócitos primários (FAYRER-HOSKEN, 1997). O processo de transformação das espermatogônias em espermatócitos primários (espermatocitogênese) envolve a divisão mitótica de espermatogônias do tipo A1 em células mais diferenciadas; espermatogônias dos tipos A2, A3,

intermediárias, B1 e B2. As espermatogônias tipo B1 e B2 dividem-se e formam dois espermatócitos primários (AMMAN; SCHANBACHER, 1983). Em touros, a fase de espermatocigênese dura 21 dias (JOHNSON et al., 2000).

Na segunda fase, ocorrem dois estágios de divisão meiótica. Esses estágios envolvem processos de duplicação de cromossomos, troca de material genético e duas divisões celulares, durando em média 23 dias (JOHNSON et al., 2000). No primeiro estágio, os espermatócitos primários se diferenciam em zigóteno, paquíteno e diplóteno. O final desse estágio se completa com uma divisão celular que resulta em uma redução de 50% no número de cromossomos. Cada espermatócito primário irá originar dois espermatócitos secundários. Esses espermatócitos secundários passam pelo segundo estágio da divisão meiótica, dando origem a um grupo celular denominado espermatídes, sendo que cada espermatócito secundário origina 4 espermatídes haplóides (JOHNSON et al., 2000; STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Na terceira e última fase, as espermatídes haplóides sofrem maturação, passando de células com nucleação esférica para células germinativas maduras, ou seja, ocorre o amadurecimento das espermatídes em espermatozóides. Nessa fase não acontece nenhuma divisão, apenas modificações morfológicas. Ocorre a formação do flagelo, também denominado de cauda, responsável pela mobilidade do espermatozóide. Forma-se ainda a cabeça, composta pelo núcleo, que contém as informações genéticas masculinas e pelo acrossoma, que possui as enzimas necessárias para permitir a penetração nas camadas do óvulo (JOHNSON et al., 2000). As organelas citoplasmáticas das células de Sertoli tem papel fundamental na modificação das espermatídes durante o alongamento nuclear e a formação do acrossoma (AMMAN; SCHANBACHER, 1983).

Após a terceira fase da espermatogênese, os espermatozóides ainda não possuem potencial fecundativo, mas se encontram aptos para se desprenderem das células de Sertoli e alcançar o lúmen do túbulo espermático. A este processo dá-se o nome de espermição (BERNE; LEVY, 2000). Os espermatozóides são gradativamente liberados dos túbulos seminíferos e chegam ao epidídimo, onde é iniciado o processo de maturação pelo qual passam a adquirir mobilidade própria e capacidade de fecundação. Essa maturação é iniciada na cabeça do epidídimo, se prolonga pelo corpo e termina na cauda, onde serão armazenados. Em touros adultos a produção diária de espermatozoides gira em média aproximada de 13 bilhões (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.9 Características indicadoras de fertilidade em machos bovinos

A eficiência produtiva e reprodutiva de um rebanho é altamente dependente da contribuição do touro, seja esta contribuição realizada por monta natural ou por inseminação artificial. Um grande número de fêmeas pode ser inseminado com o sêmen de um único touro e por isso deve-se ter alguns cuidados na escolha do reprodutor antes de usá-lo extensivamente. De uma maneira geral, busca-se nos touros reprodutores características produtivas, como potencial para produção de carne e leite, esquecendo-se, porém, de avaliar características reprodutivas que também são transmitidas geneticamente e são de grande importância para transmissão de características desejáveis à gerações futuras (COULTER; FOOTE, 1979).

Define-se fertilidade como a capacidade de gerar descendentes normais. Considera-se subfértil o animal cujo seu potencial reprodutivo é reduzido. O animal é considerado infértil quando apresenta incapacidade reprodutiva de maneira temporária. Quando a incapacidade reprodutiva do indivíduo é definitiva, o animal é considerado estéril (MIES FILHO, 1977).

São considerados touros com alto potencial fértil aqueles que, em contato com 30 a 50 fêmeas durante um período de 45 dias, consegue fecundar mais de 80% dos animais nos primeiros 21 dias. A determinação do real potencial reprodutivo de touros é realizada por exames das suas funções reprodutivas. Esses exames permitem diagnosticar anormalidades em um ou mais órgãos genitais, bem como detectar problemas físicos além de possibilitar a análise da qualidade espermática, que irá determinar os níveis de fertilidade (baixa, média, alta) e principalmente de esterilidade (SILVA et al., 1993).

O potencial fértil de um indivíduo é avaliado por exame clínico e tem como objetivo a eliminação de animais com qualidade genética inferior como também daqueles que apresentam quadros de sub ou de infertilidade. A fertilidade em touros é influenciada por inúmeros fatores, sendo extremamente complexo definir qualitativamente um reprodutor quanto a esse aspecto. Apesar disso, pesquisadores buscam estabelecer vários parâmetros biológicos a fim de apontar o potencial fértil nos machos. A fertilidade deve ser avaliada quando o animal atinge a puberdade, período no qual apresenta pelo menos um indicativo que pode ser mensurável clinicamente. Com o avançar da maturidade sexual, o diagnóstico clínico será baseado na avaliação, de forma ampla, da saúde morfoanatômica e fisiológica do touro (COSTA; SILVA et. al., 2015).

A seleção de touros pela qualidade seminal é um fator fundamental para obtenção do progresso genético do rebanho (SILVA et al., 1993). Quando níveis de importância da fertilidade no rebanho são considerados, pode-se inferir que o macho possui maior importância do que a fêmea, se atrelando essa informação à capacidade destes de gerar um alto número de descendentes, simultaneamente. Um rebanho que utiliza touros com excelente potencial fértil possui um maior número de bezerros nascidos por ano, visto que a fertilidade do macho é diretamente relacionada ao número de fêmeas gestantes. Dessa forma, numa abordagem econômica, animais que produzem sêmen de melhor qualidade possibilitam maior rapidez no retorno do capital investido, principalmente se esse reprodutor apresentar outras características desejáveis como por exemplo melhor produção de carne ou leite (SILVA et al. 2002).

Sendo a fertilidade do macho bovino a capacidade de conseguir fecundar satisfatoriamente a fêmea, diversas características indicadoras do potencial fértil precisam ser consideradas, dentre elas, aspectos zootécnicos, comportamentais, clínicos, andrológicos e espermáticos (SILVA et al., 1993). Além disso, cabe ressaltar que a infertilidade não deve ser o único critério avaliado para seleção de reprodutores, visto que mesmo um animal com alta fertilidade, pode apresentar defeitos hereditários com potencial de ser transmitidos à prole sendo posteriormente expressos (PIMENTEL, 2008).

Dessa forma, a determinação do potencial reprodutivo do macho bovino deve ser realizada por meio de uma detalhada avaliação de suas funções reprodutivas, utilizando para isso métodos adequados que permitam o diagnóstico de anormalidades. A seleção para o potencial reprodutivo é fundamentada no exame andrológico que deve ser realizado, preferencialmente, com periodicidade anual.

2.9.1 Puberdade em machos bovinos

A eficiência reprodutiva de um rebanho é mensurada através de índices zootécnicos que expressam a capacidade fertilizante e precocidade sexual de um indivíduo. A idade a puberdade é uma avaliação de extrema importância no processo de seleção dos animais com maior precocidade sexual (LUNSTRA et al., 1978). A produção espermática e o desenvolvimento testicular são considerados no processo de avaliação para puberdade (SALLES, 1995). Junto a isso ocorrem as mudanças endócrinas e espermáticas aliadas ao crescimento corporal do animal e

ganho de peso até a puberdade, variando de acordo com a raça, idade, ambiente e genética (LIMA, 2009).

Existem várias definições utilizadas para determinar a idade a puberdade de um tourinho, entretanto a definição de Wolf et al. (1965) tem sido a mais utilizada. Caracteriza-se um animal púbere aquele que produz um ejaculado com 10% de motilidade e concentração espermática com no mínimo de 50 milhões de espermatozoides (WOLF et al., 1965; LUNSTRA et al., 1988; FRENEAU, 1991). Esta definição é amplamente utilizada por abranger todas as definições anteriormente estudadas e ser facilmente obtida por meio de coleta e avaliação de sêmen (GUIMARÃES et al., 2011).

As características testiculares e seminais são parâmetros para determinação da idade à puberdade dos machos (LUNSTRA et al., 1978). Estudos demonstram uma idade à puberdade mais avançada nos animais zebuínos (25 a 28 meses de idade), quando comparado aos taurinos (12 a 14 meses de idade, quando criados em condições dos trópicos). Taurinos em condições de clima tropical se apresentam mais tardios com relação às raças taurinas criadas nas condições de clima temperado (8 a 10 meses de idade) (COSTA; SILVA, 2013). Além disso, observa-se que os animais taurinos de aptidão para leite são mais precoces do que os animais de aptidão para corte (LUNSTRA et al., 1978; GUIMARÃES et al., 2011; COSTA; SILVA, 2013).

Muitos fatores contribuem para a manifestação da puberdade em bovinos e afetam não somente o desenvolvimento sexual mais também o corpóreo. Um importante mecanismo que contribuem para o desenvolvimento corpóreo e sexual são os níveis hormonais de testosterona e IGF-1, atuando diretamente para o início da puberdade (SILVA, 2002; SANTOS et al., 2005).

Os zebuínos apresentam peculiaridades, como crescimento corporal mais lento, baixa taxa de conversão alimentar, atraso na maturidade sexual, menores libido e capacidade de serviço. Tais diferenças podem ser relacionadas às condições ambientais encontradas no Brasil, como menor disponibilidade de alimentos, qualidade nutricional inferior das forrageiras, inadequada adaptabilidade, manejo incorreto e clima (BRITTO et al., 2004; COSTA; SILVA, 2013).

De acordo com Santos et al, (2005), os animais que recebem suplementação no período pós desmame podem antecipar a puberdade, ou seja, expressarem precocemente o desenvolvimento ponderal e sexual. Com isso vê-se a importância do manejo alimentar adequado aos animais, atendendo todas as necessidades nutricionais para que possam expressar precocemente seu potencial genético ao máximo (MORAES, 2012).

Antecipar a puberdade é de extrema importância para a taxa de desfrute de um rebanho. Diminuindo a idade de entrada dos animais em reprodução, mesmo nos rebanhos submetidos à estação de monta, aumentam a perspectiva de apresentarem maior qualidade de sêmen e no caso das fêmeas, de apresentarem maior regularidade cíclica, o que melhora o desempenho reprodutivo no início da primeira estação. Além disso, a seleção de touros púberes o mais precoce possível, também proporciona vantagens econômicas, como redução de custos com alimentação e acelerar o retorno econômico aos produtores (BARTH; OMINSK, 2000; LOPEZ et al., 2006; COSTA; SILVA, 2013).

A maturidade sexual nos machos é estabelecida por volta de 6 a 20 semanas após a puberdade (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982). Segundo Moraes (2012), a maturidade sexual é alcançada por fatores como o crescimento gonadal e corporal, junto com as concentrações de testosterona e desenvolvimento sexual estabilizados. No entanto é preconizado para definir que o animal atingiu maturidade sexual quando ele apresenta características seminais com 50% de motilidade espermática progressiva e morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores.

Segundo Costa e Silva (2013) animais zebuínos demonstram puberdade com idade em torno de 25 a 28 meses enquanto animais taurinos têm essa idade em média de 12 a 14 meses. Animais taurinos alcançam a maturidade sexual em média dos 13 a 16 meses de idade em climas temperados, já em climas tropicais esse período até a maturidade sexual aumenta para 16 a 20 meses de idade (FRENEAU, 1991). Animais zebuínos se apresentam ser bem mais tardios, atingindo a maturidade sexual em média dos 30 a 36 meses de idade (GUIMARÃES et al., 2011).

2.9.2 Exame andrológico

Um touro pode apresentar sub ou infertilidade por ocorrência de problemas na qualidade do sêmen, por não conseguir realizar o ato sexual e por consequência ser incapaz de depositar seu sêmen no trato genital da vaca, e/ou por ser portador de doenças que afetem sua saúde sexual (PIMENTEL, 2008). O exame andrológico possibilita a coleta de informações e é utilizado como principal indicador do potencial reprodutivo de machos bovinos. Permite diagnosticar anormalidades anatomofisiológicas nos diversos órgãos genitais bem como detectar problemas na qualidade espermática (SILVA et al., 1993).

Diversas avaliações devem ser realizadas com a finalidade de realizar um exame completo. Zootecnicamente, deve-se avaliar os padrões fenotípicos raciais, o temperamento e a masculinidade que podem comprometer o comportamento de monta e o comportamento sexual, o estado e a conformação corporal e os problemas de aprumos. Na avaliação de comportamento reprodutivo leva-se em conta a libido, a capacidade de monta, que é a capacidade de um macho cobrir a mesma fêmea por várias vezes num determinado período de tempo, e a dominância. No exame clínico geral devem ser avaliados respiração, pulso, contrações ruminais, temperatura corporal, linfonodos, olhos, boca, narinas, dentes. Deve-se ainda buscar diagnosticar doenças que possam ser responsáveis por causar sub ou infertilidade (CBRA, 2013; SILVA et al., 1993).

No exame andrológico propriamente dito, as estruturas do sistema reprodutor são avaliadas em busca de lesões ou quaisquer anormalidades que possam comprometer a fecundação. O exame é feito interna e externamente, sendo que no exame interno se avalia glândulas vesiculares, ampolas deferentes, próstata e glândula bulbouretral, enquanto no exame externo são avaliados, pênis, prepúcio, epidídimo, escroto e testículos. Dada importância na qualidade seminal, uma completa avaliação da capacidade reprodutiva do macho só estará completa após a realização do exame espermático. Avalia-se nesse exame características físicas do sêmen (volume, aspecto, cor e pH), bem como a motilidade, o vigor, o turbilhonamento, o percentual de espermatozoides vivos e mortos, a concentração espermática, bem como as características morfológicas dos espermatozoides (CBRA, 2013; SILVA et al., 1993).

Um sêmen de qualidade apresenta motilidade espermática progressiva e retilínea e baixa taxa de espermatozoides anormais. Os padrões recomendados para utilização do sêmen bovino estabelecem que a motilidade progressiva e o vigor devem ser igual ou maiores do que 30% e 3 (numa escala de 1 a 5), respectivamente. Em relação a características morfológicas é estabelecido valor mínimo de 70% de espermatozoides normais, tolerando-se até 20% de espermatozoides com defeitos maiores ou e até 30% de defeitos menores (BRASIL, 2009).

Como exemplos de defeitos maiores cabe citar o subdesenvolvimento, “*knobbed sperm*”, decaptados, formas duplas, “*pouch formation*”, piriforme, base estreita, cabeça pequena anormal, cauda fortemente dobrada e enrolada, dentre outros. Esses defeitos maiores são consequentes de anomalias ocorridas a nível de testículo e/ou epidídimo e quando ocorrem em porcentagem elevada são associados a distúrbios da espermatogênese, podendo ser relacionados à sub ou à infertilidade. Já os defeitos menores são anomalias de menor importância e não indicam

necessariamente defeitos na espermatogênese. Em geral não afetam a fertilidade, quando dentro de percentuais estabelecidos. Como exemplos cabe citar; cabeça pequena, delgada, curta, cauda dobrada e enrolada, destacamento do acrossoma, dentre outros (BLOM, 1973; SILVA et al., 1993).

A morfologia espermática possibilita fechar diagnóstico diferencial entre diversas alterações clínicas reprodutivas e por isso não pode ser deixada de lado na escolha de reprodutores. Com base nesse diagnóstico é possível decidir o destino que será dado a determinado animal, baseando-se na possibilidade de reversão da subfertilidade e no potencial de transmissibilidade genética de características desejáveis/indesejáveis (HOLROYD et al., 2002).

De uma maneira geral, ao final do exame andrológico, os animais podem ser classificados em aptos, quando não apresentarem nenhum tipo de restrição; aptos com restrição, quando algumas características indesejáveis são reversíveis; inaptos temporários, quando o animal apresenta quadro comum a problemas genéticos ou adquiridos. Nesses casos, deve-se realizar exames para diagnóstico diferencial e se a alteração for adquirida, o animal pode ser liberado após a recuperação, porém se a alteração for genética, deverá ser descartado, mesmo que tenha excelente potencial fértil. Classificam-se ainda em inaptos definitivos quando apresentam patologias irreversíveis, incluindo-se também os animais que apresentam uma circunferência escrotal abaixo do mínimo exigido para sua faixa etária (COSTA; SILVA et. al., 2015).

Ao longo dos anos, técnicas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de prever se determinadas características testiculares, avaliadas no exame andrológico, estão correlacionadas com a produção espermática bem como com a fertilidade e com a qualidade do sêmen. A circunferência escrotal, também conhecida como perímetro escrotal é um técnica que está relacionada com a produção de espermatozoides. É uma medida de alta repetibilidade e relativamente fácil de se obter, desde que os touros estejam devidamente contidos (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008; PACHECO, 2005)

2.9.3 Circunferência escrotal

A determinação da CE é fundamental no exame andrológico de touros. Essa medida tem grande valor como indicativo de puberdade, de produção e qualidade de sêmen, de condições patológicas testiculares e pode ser um excelente preditor do potencial reprodutivo (OTT, 1986).

Tal mensuração é amplamente difundida devido à sua fácil obtenção e alta repetibilidade. (COULTER; FOOTE, 1979; BERGMANN, 1999; GUIMARÃES et al., 2011; COSTA; SILVA, 2013).

A idade é um dos principais fatores que influencia o desenvolvimento das gônadas e, conseqüentemente, o desenvolvimento da CE (NEVES, 2007). De acordo com Lunstra et al. (1978) e Dias et al. (2008), a CE tem alta correlação (0,54 a 0,95) com a idade dos reprodutores. Pinto et al (1989) relataram que a CE na raça Nelore variaram de 25 cm entre animais com idade entre 16 e 19 meses e 27 a 28,5 cm em animais com idade entre 20 e 22 meses. Oliveira et al. (2002), trabalhando com animais das raças Limousin e Kroetz et al. (2006), com animais das raças Charolez e Caracu, obtiveram uma média de CE de 33,5 - 34,4 e 32,2 (respectivamente) quando avaliados aos 16 meses de idade.

A CE apresenta alta correlação (0,67 a 0,94) com idade à puberdade dos seus descendentes (SMITH et al., 1989; BERGMANN, 1993). É comprovado que touros precoces apresentam maior CE do que touros com maturação tardia (BRITO et al., 2004). A CE está também relacionada com particularidades herdada por fêmeas bovinas. Estudo realizado com gado nelore por Boligon, Rorato e Albuquerque. (2007), correlacionou circunferência escrotal de machos com 18 meses de idades a características produtivas medidas em fêmeas. Foi verificado que quanto maior a CE, menor idade ao primeiro parto e maior peso após o primeiro ano de nascimento das progênes. Dessa forma sugere-se que uma seleção direta na CE de touros reflete indiretamente em característica genéticas das suas filhas, possibilitando uma melhoria na eficiência reprodutiva de fêmeas.

A CE está correlacionada positivamente com características físicas do sêmen, com a idade a puberdade, com a precocidade sexual e o ganho de peso (KASTELIC et al., 2001). Existe correlação entre as mensurações testiculares realizadas mais precocemente e após a incidência da puberdade (FRENEAU, 1991). Almquist et al. (1976) e Coulter e Keller (1982) observaram altas correlações que variam entre 0,76 a 0,80, para CE e idade aos 12 e 24 meses.

Estudo realizado com 129 touros mestiços de Angus, com idade aproximada de 16 meses, objetivou relacionar a CE com a motilidade espermática, com defeitos espermáticos primários e com as reservas de espermatozoides no epidídimo. Como resultados, obteve-se uma relação positiva entre CE e a motilidade espermática, bem como com a CE e as reservas de

espermatozoides. Foi encontrada ainda relação negativa entre a CE e os defeitos espermáticos primários (KASTELIC et al., 2001).

2.9.4 Hormônio anti- Mülleriano (AMH) em machos

O AMH é expresso em todos os mamíferos, independentemente do gênero, entretanto, suas funções são diferentes, porém, relacionadas com o desempenho reprodutivo em ambos os sexos. No macho, a produção de AMH ocorre nas células de Sertoli ainda na fase fetal. A partir do momento em que ocorre a diferenciação das células de Sertoli no feto, inicia-se a produção de AMH sendo que essa produção permanece até o aparecimento da espermatogênese na puberdade sendo expressos em concentração basal na idade adulta (JOSSO et al., 1993; LEE; DONAHOE, 1993). No feto humano, as células de Sertoli diferenciam-se a partir da sétima semana podendo ser possível visualizar seu RNAm através de hibridação *in situ* a partir da oitava semana (PEREZ; JÚNIOR, 2000). Em bovinos, estima-se que o início da produção de AMH ocorra por volta de 50 a 80 dias de gestação (VIGIER et al., 1984).

A principal função do AMH em machos está relacionada à diferenciação sexual. Quando um oócito é fertilizado por um espermatozoide contendo o cromossomo Y, ocorre uma sinalização para expressão do gene SRY (Sex-determining region of Y chromosome) que induz a expressão do gene que é traduzido na proteína AMH pelas células de Sertoli. Na presença de AMH, os ductos de Muller que originariam as estruturas reprodutivas femininas (útero, tuba uterina, ovários, vagina) sofrem atrofia e os ductos de Wolf desenvolvem pela ação da testosterona produzida pelas células de Leydig (MUNSTERBERG; LOVELL-BADGE, 1991). Quando não há produção do AMH, o feto diferencia-se em fêmea (REY et al., 2003).

Os mecanismos envolvidos na relação entre AMH e desempenho reprodutivo em machos não são bem elucidados como nas fêmeas, entretanto, novas pesquisas vem sendo realizadas com o objetivo de utilizar o AMH como marcador de precocidade sexual.

Estudos demonstraram que a expressão reduzida de AMH pelas células de Sertoli está diretamente relacionada com o aparecimento da espermatogênese nos túbulos seminíferos (ALMEIDA et al., 2012). Baixa concentração de AMH ocasionam alterações morfológicas e funcionais do trato reprodutor como a perda da atividade proliferativa das células testiculares e surgimento das junções intercelulares. Essas alterações dão suporte à atividade espermatogênica

no período da pré-puberdade. Em humanos, estudos comprovaram que a concentração de AMH permanecem baixas durante os dois primeiros dias após o nascimento, mas elevam-se rapidamente e se mantêm até a chegada da puberdade, decrescendo a valores basais em adultos (LEE et al., 1996).

Kitahara et al. (2016) determinaram o tempo de evolução das concentrações de AMH e testosterona (T) no sangue durante os períodos pós-natal e pré-puberal em bovinos, concluindo que a concentração de AMH no sangue atinge o pico aos 2 meses de idade e está negativamente correlacionada com a concentração sanguínea de T de 4 a 6 meses de idade.

Claes et al. (2013) determinaram as concentrações séricas de AMH em potros e potros neonatais, potros pré-púberes e garanhões pós-púberes, e suas as variações séricas de AMH relacionadas à estação e ao status gonadal de garanhões, observando que as concentrações séricas de AMH são significativamente mais altas em potros neonatais que em potros, e maiores em potros pré-púberes em comparação com garanhões pós-púberes. Além das diferenças relacionadas ao sexo e ao desenvolvimento, há uma variação sazonal nas concentrações de AMH entre os garanhões maduros intactos com maiores concentrações de AMH durante a estação de reprodução fisiológica, além de observarem maiores concentrações séricas de AMH em garanhões criptorquídeos do que em garanhões intactos ou em castrados, concluindo que o AMH parece ser um biomarcador útil para a presença detectado testicular e pode servir como uma valiosa alternativa no diagnóstico endócrino de cavalos criptorquídeos ou monorquídeos

Embora as concentrações de AMH ou T no sangue pré-puberal não refletissem o número de células de Sertoli ou Leydig no final do período pré-puberal, a concentração de AMH no sangue pode ser indicativa de função celular anormal de Sertoli.

Concentração de AMH e o início da espermatogênese são eventos opostos. A diminuição do AMH é reflexo da incidência de receptores de andrógenos presentes nas células testiculares. Dessa forma, existe uma relação inversa entre AMH e testosterona. O AMH regula a síntese de andrógenos quando presente em concentração elevada através da supressão da transcrição do gene P450c17 que codifica a produção de enzimas responsáveis por realizar a esteroidogênese (17,20 desmolase e 17 α hidroxilase) (TEIXEIRA et al., 1999). Em estudo realizado por Almeida et al. (2012), em equinos, há uma redução na expressão do RNAm para AMH e seu receptor a medida que há um aumento da expressão de RNAm para os receptores de andrógenos nas células de Sertoli. Sendo assim, pode-se inferir que a testosterona atua nos receptores de andrógenos,

através de uma ação parácrina, inibindo a secreção do AMH pelas células de Sertoli (PASQUALINI et al., 1981; REY et al., 2003).

Detecção de precocidade sexual através da mensuração da concentração de AMH vem sendo o foco de algumas pesquisas na área humana e animal. Em humanos, a concentração de AMH foi inferior em crianças que apresentaram puberdade precoce em relação com aquelas que atingiram a puberdade em idades consideradas normais (REY et al., 1993). Em animais, as pesquisas mais difundidas são com equinos e também foi evidenciado o padrão de concentração inferior de AMH em potros que possuíram puberdade precoce (BALL et al., 2008; CLAES et al., 2013). Em bovinos, entretanto, pesquisas devem ser realizadas para detectar se o mesmo padrão observado em humanos e equinos também acontece tendo em vista a escassez de estudos nesta espécie. Poucos estudos avaliam a concentração de AMH como indicador de precocidade sexual em bovinos, dentre eles o realizado por Queiroz (2014). Nesse estudo, 37 tourinhos foram submetidos à 3 coletas de sangue em intervalos de 3 meses para determinar se as alterações na concentração de AMH iriam prever puberdade precoce. Conclui-se que o AMH pode ser um marcador endócrino efetivo na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios com uma única coleta sanguínea. Caso seja confirmada essa relação, a dosagem de AMH poderá ser um marcador de precocidade sexual utilizado em programas de seleção animal para detecção de animais reprodutivamente superiores.

Rajak et al. (2017) investigaram as mudanças relacionadas à idade nas concentrações basais de AMH em amostras de sangue periférico em machos mestiços (Holstein Friesian x Tharparkar) e zebuínos (Tharparkar) e a transcrição do gene AMH no tecido testicular. Em ambas as raças, as concentrações basais de AMH foram estimadas usando o método ELISA no plasma sanguíneo obtido de seis machos cada um com 1, 6, 12, 18 e 24 meses de idade. Após a coleta de sangue nas respectivas idades, todos os machos foram castrados e a expressão e imunolocalização do AMH foram realizadas no tecido testicular. Esses pesquisadores observaram que as concentrações sanguíneas periféricas de AMH foram maiores em jovens em comparação com adultos em machos mestiços e zebuínos. A expressão do gene AMH no tecido testicular foi significativamente maior no Zebu em comparação com os machos mestiços, embora as concentrações periféricas de AMH não seguissem o mesmo padrão. Além disso, a contagem de células de Sertoli também foi significativamente maior no Zebu em comparação com os machos

mestiços e as células de Sertoli amadureceram mais cedo em mestiços comparados com os machos Zebu.

3 CONCLUSÃO

A concentração plasmática do hormônio anti-Mülleriano foi indicativo de maior contagem folicular antral e produção oocitária em fêmeas e de melhores parâmetros seminais em machos jovens. Ademais, a morfometria da genitália (largura vulvar e circunferência escrotal) foram bons indicadores da capacidade reprodutiva em fêmeas e machos zebuínos e taurinos. Os marcadores estudados tiveram efeito positivo sobre alguns parâmetros reprodutivos, portanto, a proposta de utilização desses fenótipos deve ser considerada em modelos destinados à seleção reprodutiva de fêmeas e machos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. **Human Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 398-408, 2004.
- ALMQUIST, J.O.; AMANN, R.P. Puberal characteristics and post puberal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently. *Journal of Dairy Science*, v. 59, n.5, p. 986-991, 1976.
- ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, may. 2000.
- ALMEIDA, J. et al. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. **Theriogenology**, v.77, p. 847-857, 2012.
- AMMAN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 2, p. 380-403, 1983.
- ANDERSEN, C. Y; BYSKOV, A. G. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, p. 4064-4069, 2006.
- ANDERSON, J. The semen of animals and its use for artificial insemination. **Edinburg, Imperial Bureau of Animal Breeding and Genetics**, Oliver & Boyd, 1945, 151 p.
- BAARENDS, W. M. et al. A. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. **Endocrinology**, v. 136, p. 4951-4962, 1995.
- BALL, J. H; PETERS, A. R. **Reproduction in Cattle**, 3 ed. Oxford: Blackwell, 2004, 250 p.
- BALL, B. A. et al. Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in the equine testis. **Theriogenology**, v. 69, p. 624-631, 2008.
- BANCSI, L. F. et al. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. **Fertility and sterility**, v. 77, p. 328-36, 2002.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1992, 629 p.
- BARTH, A.D.; OMINSK, K.H. The relation ship between scrotal circumference at we aningandatone year of age in beef bulls. *Canadian Veterinary Journal*, v.4, p.541-546, 2000.

BATISTA, E. O. S. et al. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.

BERGMANN, J.A.G. Melhoramento genético da eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993, Belo Horizonte MG, Suplemento... CBRA: Belo Horizonte, 1993. p.70-86.

BERGMANN, J.A.G. Seleção de zebuínos para precocidade sexual. In: I SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, Viçosa-MG. Anais...SRGC: Viçosa, p.51-64, 1999.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. As Glândulas Reprodutoras. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 52, p. 920-931.

BÉZARD, J. et al. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 509-516, 1987.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicine**. v.25, n. 7, p.383-39, 1973.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, 2004.

BOCCACCIO, A. et al. Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine zona pellucida. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 76, p. 2871-2882, 2012.

BOLIGON, A.A.; RORATO, P.R.N.; ALBUQUERQUE, L.G. Correlações genéticas entre medidas de perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 565-571, 2007.

BRAGANÇA, L. G. M. et al. The number of oocytes recovered from Holstein donors has no effect on the pregnancy establishment of in vitro embryo programs. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 433, 2014 (abstract).

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Portaria n° 109, de 25 de maio de 2009. Institui Grupo de Trabalho no âmbito do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários - DFIP/SDA, com a finalidade de atualizar o Manual de Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 maio 2009. Seq. 1, p.5.

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. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005.

- CAMARGO, L. S. A. et al. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 53-59, 2005.
- CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifer. **Theriogenology**. v. 69, p. 167–175, 2008.
- 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. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 189-196, apr. 2007.
- CATE, R.L. et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. **Cell**, v. 45, p. 685–698, 1986.
- CHACUR, M. G. M. et al. Morphometry of ovaries of female zebu *Bos taurus indicus* collected in slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 65-70, fev. 2006.
- CLAES, A. et al. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**. v. 79, p. 1229-1235, 2013.
- CHEONG, S. H.; GILBERT, R. O. Massive vulvar edema in 2 prepartum dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, p. 462-465, 2014.
- COHEN-HAGUENAUER, O. et al. Mapping of the gene for anti-mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 44, p. 2-6, 1987.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p.
- COULTER, G.H; FOOT, R.H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**. v. 11, n. 4, p. 1229-1235, 1979.
- COULTER, G. H.; KELLER, D.G. Scrotal circumference of young beef bulls: Relations hip to paired teste weight, effect of breed and predictability. *Journal of Animal Science*, v.62, n.91, p.133-139, 1982.
- CORBET, N.J. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. *Animal Production Science*, v. 53, n. 2, p. 101-113, 2013.
- COSTA E SILVA, E.V, et al. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 22-31, 2015.
- COSTA e SILVA, E.V.; FERREIRA, B.X.; QUEIROZ, V.L.D. et al. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.97-104, 2013.

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. **Journal Animal Science**, Champaign, v.87, n. 6, p.1971–1980, 2009.

CUSHMAN, R. A. et al. Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, n. 2, p. 349–354, 1999.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M. et al. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.1, p.53-59, 2008.

DI CLEMENTE, N. et al. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase activity and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. **Endocrine**, v. 2, p. 553–558, 1994.

DINIZ, E. G. et al. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 70-76, 2005.

DOMENICE, S. et al. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolism**, v. 46, p. 433-443, 2002.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

DUKES, H. H.; SWENSON, M. J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Editora Guanabara Koogan, 1996.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 2, p. 303-16, 2015.

DURLINGER, A.L. et al. (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, p. 5789–5796, 1999.

DURLINGER, A. L. L.; VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 5, p. 601–609, 2002.

EBORN, D. R. et al. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. **Journal Animal Science**, v. 91, p. 4168-4179, 2013.

EDMONSON, A. J. et al. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 68-78, 1989.

EL-SHEIKH, H. A. et al. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. **Theriogenology**, v. 80, p. 940–949, 2013.

ERICKSON, B. H. Development and radio respons of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 11, p. 91–105, 1966a.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, p. 800–805, 1966b.

EWING, L.L.; BROWN, B.L. Testicular steroidogenesis. In: JOHNSON, A.D. & GOMES, W.R. **The testis**. v. 4. New York, Academic Press, 1977, 239 p.

FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.

FANCHIN, R. et al. AntiMüllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, p. 1796-1802, 2007.

FAYRER-HOSKEN, R. Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, n. 2, p. 195-202, 1997.

FRANDSON, R. D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. Cap. 26-27, p. 325-345.

FRENEAU, G.E. **Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir desde os deis até os 21 meses de idade (puberdade e pós-puberdade)**. 1991. 194p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1991.

GAO, Q; WOMACK, J. E. A genetic map of bovine chromosome 7 with an interspecific hybrid backcross panel. **Mammalian genome**, v. 8, p. 258-261, 1997.

GIULI, G; SHEN, W. H; INGRAHAM, H. A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. **Development**, v. 124, p.1799 – 1807, 1997.

GOSDEN, R. G. et al. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 2, p. 813-825, 1988.

GUERREIRO, B. M. et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* Donos. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.49, p. 96–104, 2014.

GUIMARÃES, J.D.; GUIMARÃES, S.E.F.; SIQUEIRA, J.B. et al. **Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.40, p.379-388, 2011.

GUPTA, P. S. P. et al. Regulation and regulatory role of WNT signaling in potentiating FSH action during bovine dominant follicle selection. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100201, 2014.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, 513 p.

HIENDLEDER, S.; LEWALSKI, H.; JANKE, Axel. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. **Cytogenetic and genome research**, v. 120, n. 1-2, p. 150-156, 2008.

HIROBE, S; HE, W.W; LEE, M.M.; DONAHOE, P.K. Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. **Endocrinology**, v. 131, p. 854–862, 1992.

HIROBE, S. et al. Müllerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or Graafian follicle selection. **Biology and Reproduction**, v. 50, p. 1238–1243, 1994.

HOFFMANN, E.; FAILING, K.; WEHREND, A. Changes of the vulva and the vestibulum in suckler cows and heifers during the last seven days ante partum. **Tierarztl Prax Journal**, v. 34, p. 15-19, 2006.

HOLROYD, R.G, et al. Bull selection and use in northern Australia 4: calf output and predictors of fertility of bulls in multiplesire herds. **Animal Reproduction Science**, v.71, n. 1, p. 67-79, 2002.

HOPPER, R. M. **Bovine Reproduction**, 3 ed. Pondicherry: Blackwell, 2015, 819 p.

IRELAND, J. J. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1648-1658, 2000.

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. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 1687–1695, 2007.

IRELAND, J. L. H. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219–1225, 2008.

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. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 954–964, 2009.

IRELAND, J. J. et al. (2010). **Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters** In: 43rd Annual Meeting for the Society for Study of Reproduction?. (Society for Study of Reproduction/HighWire Press: Milwaukee, USA.

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-müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2011.

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. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1272–1281, 2009.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. Concentration of anti- Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3036-3045, 2015.

JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p. 471-480, 2000.

JOSSO, N. et al. Anti-müllerian hormone: the Jost factor. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 48, p. 1-59, 1993.

JOSSO, N; DI CLEMENTE, N; GOUEDARD, L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 179, p. 25-32, 2001.

JOSSO, N. et al. Clinical aspects and molecular genetics of the persistent Müllerian duct syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 47, p. 137–144, 1997.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 2, p. 111-115, 2001.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 43, n. 2, p. 368-373, 2008. Suppl. 2.

KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3329-3337, 2003.

KHATON, R.; SARDER, M. J. U.; GOFUR, M. R. Biometrical Studies of Reproductive Organs of Dairy Cows of Different Genotypes in Bangladesh. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 6, p. 388-395, 2015.

KITAHARA, G. et al. Changes in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 57, p. 127-132, 2016.

- KROETZ, I.A.; TAHIRA, J.K.; PEROTTO, D. et al. Circunferência escrotal e características de sêmen de touros Charolês, Caracu e cruzamentos recíprocos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 24, p. 101-106, 2006.
- KONIG, H. E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 6. ed. Porto Alegre: Grupo A Educação, 2016, 824 p.
- LAYEK, S. S. et al. Behavioural signs of estrus and their relationship to time of ovulation in Zebu (Sahiwal) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 140-145, 2011.
- LEE, M. M.; DONAHOE, P. K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. **Endocrine Reviews**, v. 14, p. 152-164, 1993.
- LEE, M. et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 571-576, 1996.
- LIMA, F.P.C. **Puberdade em tourinhos da raça Nelore avaliada pelo perímetro escrotal, características seminais e endócrinas**. 2009. 65p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2009.
- LOPEZ, R.; THOMAS, M.G.; HALLFORD, D.M. et al. Case study: metabolic hormone profiles and evaluation of associations of metabolic hormones with body fat and reproductive characteristics of Angus, Brangus and Brahman heifers. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 273-282, 2006.
- LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 1054-1062, 1978.
- LUNSTRA, D.D.; GREGORY, K.E.; CUNDIFF, L.V. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology**, v. 30, p. 127-136, 1988.
- LUNSTRA, D.D.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 638-648, 1982.
- MACULAN, R. et al. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal reproduction science**, v. 189, p. 84-92, 2018.
- MACULAN, R. et al. Antral follicle count, vulva with, and fertility traits in bos taurus indicus cattle (tabapuã). **Reproduction, Fertility and Development**, p. 196, 2016 (resumo).
- MADKAR, A. R. et al. Estrus conformation on the basis of behavioural signs of intensity in cross breed cows. **Indian Veterinary Journal**, v. 92, p. 60-61, 2015.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 7, p. 1344-1349, 2005.

MCNEEL, A. K. et al. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. **Animal Reproduction Science**. v. 179, p. 1–9, 2017.

MERCÉ, L.T. et al. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. **Human Reproduction**. v. 21, p. 1218-1226, 2006.

MESQUITA, N. F. et al. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 62, n. 6, p. 587-590, 2016.

MIES FILHO, A. Dados históricos da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1977.

MODINA, S. et al. Reductions in the number of mid-sized antral follicle are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 235-244, 2014.

MONNIAUX, D. et al. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 1083-1091, 2010.

MONNIAUX, D. et al. Regulation of antiMüllerian hormone production in domestic animals. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, p. 1-16, 2013.

MORAES, G.P. **Puberdade e maturidade sexual de tourinhos Senepol, criados semi-extensivamente na região do Triângulo Mineiro – MG**. 2012. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2012.

MOSSA, F. et al. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 95, p. 2355-2361, 2012.

MUNSTERBERG A; LOVELL-BADGE R. Expression of the mouse antiMüllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation **Development**, v.113, p. 613–624, 1991.

NEVES, A.L.A. **Biometria e morfologia testicular em bovinos da raça nelore criados a pasto**. 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-BA, 2007.

NICHOLSON, M. J.; BUTTERWORTH, M. H. **A guide to condition scoring of zebu cattle**. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 1986. 29 p.

- OLIVEIRA, J. F. et al. Follicular development and steroid concentrations in cows with diferente levels of fertility raised under nutritional stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 1-10, 2002.
- OTT, R. S. Breeding soundness evaluation in bulls. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 125.
- PACHECO, A. **Efeito da idade e de fazenda sobre as características seminais, medidas testiculares e morfométricas e suas repetibilidades em touros da raça Guzerá**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2005.
- PATTERSON, D. J; CORAH, L. R. Evaluation of a melengestrol acetate and prostaglandin F2 α system for the synchronization of estrus in beef heifers. **Theriogenology**, v. 38, p. 441-447, 1992.
- PASQUALINI, T; CHEMES, H; RIVAROLA, M. A. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. **Clinical Endocrinology**, v. 15, p. 545-554, 1981.
- PELLATT, L. et al. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 96, p. 1246-1251, 2011.
- PEPINSKY, R. B; SINCLAIR, L. K; CHOW, E. P. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-P-like fragment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 18961-18965, 1988.
- PEREZ, E. G. S; JÚNIOR, G. G. Hormônio Anti-Mülleriano: Revisão e Contribuição para a Investigação das Ambigüidades Genitais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 44, p. 425-433, 2000.
- PFEIFFER, K.E., JURY, L.J., LARSON, J.E. Determination of Anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 46, p. 58-64, 2014.
- PICTON; H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, 1998.
- PIMENTEL, C.A. Avaliação da fertilidade masculina em bovinos. In: 1º SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO EM BOVINOS, 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: EMBRAPA, 2008. p. 7-22.
- PINTO, P.A.; SILVA, P.R.; ALBUQUERQUE, L.G. et al. Avaliação da biometria testicular e capacidade de monta em bovinos das raças Guzerá e Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 3, p. 151-156, 1989.
- QUEIROZ, V. L. D. **Hormônio anti-mülleriano sérico como preditor da puberdade de touros jovens nelore**. 2014. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2014.

RAJAK, S.K. et al. Age-related changes in transcriptional abundance and circulating levels of anti-Müllerian hormone and Sertoli cell count in crossbred and Zebu bovine males.

Theriogenology, v. 89, p. 1-8, 2017.

REY, R. et al. Antimüllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 77, p. 1220-1226, 1993.

REY, R. et al. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 211, p. 221-231, 2003.

RIBEIRO, E.S. et al. Plasma anti-müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 6888–6900, 2014.

RICO, C. et al. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 1, p. 50-59, 2009.

RICO, C. et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 3, p. 560-571, 2011.

ROCHA, R. M. P et al. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (AMH). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1138, 2013.

RODRIGUES, Alexandra Soares et al. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 801-804, 2013.

RODRIGUES, A. S. et al. Antral follicle count in nelore females subjected to fixed-time artificial insemination. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 711-717, 2015.

SALLES, P.A. **Crítérios de seleção para características de crescimento em machos da raça nelore**. 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Ribeirão Preto-SP, USP, 1995.

SANTOS, S. S. D. et al. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 344-350, 2013.

SANTOS, G. M. G et al. 233 high numbers of antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in Nelore cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 27, p. 206-206. 2014.

SANTOS, G. M. G. et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal reproduction science**, v. 165, p. 17-21, 2016.

SANTOS, K.J.G.; MELO, C.S.; PALES, A.P. Seleção de touros através da puberdade, maturidade e fatores envolvidos na fertilidade. **Revista Eletrônica da Faculdade de Montes Belos**, v. 1, n. 1, p. 72-87, 2005.

SARAIVA, M. V. A. et al. FSH and LH enhance the development of goat preantral follicles cultured in vitro. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 2, p. 71-79, 2012.

SCHEETZ, D. et al. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2012.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. **Capacidade reprodutiva do touro de corte**: funções, anormalidades e fatores que influenciam. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1993, 128 p.

SILVA, A.E.D.F, et al. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA MARQUES, R. et al. Caracterização morfológica da região intercaruncular uterina de vacas e búfalas gestantes. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 103-114, 2007.

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. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.et al. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 48–51, 2014.

SINGH, Jaswant et al. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 227-243, 2004.

SISSON, C.R. Aparelho urogenital do ruminante. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, v. 1, 1996, p. 879-895.

SISSON, S.; GROSSMAN, J. D.; GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1, p. 887-893.

SMITH, M.F.; BRINKS, J.S.; RICHARDSON, G.V. Estimation of genetic parameters among sound ness examination components and growth traits in year ling bulls. **Journal of Animal Science**, v. 67, p.2892-2896, 1989.

SNELLING, W. M. et al. Physiology and Endocrinology Symposium: How single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1152–1165, 2012.

- SOUZA, A. H. et al. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 169-178, 2015.
- SOUZA, J. C. et al. Antral follicle counts, vulva width, and serum anti-mullerian hormone concentrations in bovine females of the Tabapuã breed. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 195, 2016 (resumo).
- SPLAN, R. K; CUNDIFF, L. V; VAN VLECK, L. D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2272–2278, 1998.
- STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos Reprodutivos do Macho. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes - **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 35, p. 603-614.
- STAIGMILLER, R. B.; ENGLAND, B. G. Folliculogenesis in the bovine. **Theriogenology**, v. 17, n.1, p. 43-52, 1982.
- STOJSIN-CARTER, Anja et al. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Animal reproduction science**, v. 167, p. 51-58, 2016.
- STREYL, D. et al. Establishment of a standard operating procedure for predicting the time of calving in cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, p. 177-185, 2011.
- SU, L. et al. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184–189, 2012.
- TAKAHASHI, C. et al. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 586-591, 2008.
- TAKAHASHI, M.; KOIDE, S. S.; DONAHOE, P. K. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 47, p. 225–234, 1986.
- TAKETO, T. et al. Müllerian inhibiting substance production associated with loss of oocytes and testicular differentiation in the transplanted mouse XX gonadal primordium. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 13–23, 1993.
- TEH, A. P. P. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of granulosa cells during different stages of folliculogenesis in bovine ovaries. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 569-581, 2018.
- TEIXEIRA, J. et al. Müllerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. **Endocrinology**, v. 140, p. 4732–4738, 1999.

- UENO, S. et al. Müllerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 125, p. 1060–1066, 1989.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.
- 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. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 979–987, 2005.
- VERNUNFT, A. et al. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, p. 74-79, 2015.
- VIANA, J. H. M. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, 2000.
- VIGIER, B. et al. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1315-1320, 1984.
- WALSH, S. et al. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4503-4511, 2014.
- WATANABE, M. R. et al. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 438, 1999.
- WEENEN. C. et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 77-83, 2004.
- WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Pre pubertal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v. 24, p. 761, 1965.
- YÁNIZ, J. L. et al. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 268-278, 2000.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

RELAÇÕES ENTRE CONTAGEM FOLICULAR ANTRAL, LARGURA VULVAR, CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO E FERTILIDADE EM FÊMEAS *BOS TAURUS E BOS INDICUS*

Artigo formatado segundo as normas da revista *Animal Reproduction Science*

Relações entre Contagem Folicular Antral, Largura Vulvar, Hormônio anti-Mülleriano e Fertilidade em Fêmeas *Bos Taurus e Bos Indicus*

R. Maculan^a, G. L. Vasconcelos^a, Jesús Alfonso Sánchez Viafara^a, Gabriel Miranda Moreira^a, Cintia Vanin^a, Nathalia Alves^a, Marcos Brandão Dias Ferreira, José Camisão de Souza^a

^aAnimal Science Department, Federal University of Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

^bEPAMIG - Agricultural Research Company of Minas Gerais, CEP 31170-495, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding address (J. C. Souza): Animal Science Department, Federal University of Lavras, CâmpusUniversitário, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil, Caixa Postal 3037.

Phone/Fax: +55 35 3829-1231 [jcamisao@yahoo.com.br]

Resumo

Devido à baixa herdabilidade das características reprodutivas a busca por marcadores que possam indicar indivíduos reprodutivamente superiores torna-se importante no processo de seleção para eficiência reprodutiva. Foram investigadas as relações entre a contagem folicular antral (CFA), largura vulvar (LV) e concentrações de AMH sobre os índices de eficiência reprodutiva em fêmeas taurinas e zebuínas. A CFA e LV foram medidas em nulíparas, primíparas e múltiparas das raças Brahman (n = 126), Simental e Angus (n = 155). Os índices de eficiência reprodutiva avaliados foram: idade ao primeiro parto (IPP), intervalo parto ao primeiro serviço (IPPS), intervalo de partos (IDP), número de serviços por concepção (SC) e ovócitos viáveis (OV). Uma amostra de sangue por animal foi coletada em estágios aleatórios do ciclo reprodutivo para determinar as concentrações séricas de AMH. Foram definidas classes de largura vulvar

(CLV) como: grande (≥ 86 mm) e pequena (< 86 mm) e de AMH como baixo: ($< 0,81$ ng/mL) e alto ($\geq 0,81$ ng/mL). O procedimento GLIMMIX do SAS[®] foi utilizado para avaliar os efeitos de raça, CLV e de AMH sobre a CFA, IPP, IPPS, IDP, SC e OV. A CFA ($36,30 \pm 1,34$ vs. $22,09 \pm 1,67$), LV ($106,94 \pm 15,83$ vs. $69,78 \pm 14,11$ mm) e AMH ($1,18 \pm 0,07$ vs. $0,42 \pm 0,05$ ng/mL) foram superiores nas fêmeas zebuínas em comparação às taurinas, respectivamente. A CFA ($36,10 \pm 1,90$ vs. $22,78 \pm 1,64$), o AMH ($1,17 \pm 0,07$ vs. $0,48 \pm 0,007$ ng/mL) e OV ($18,86 \pm 1,76$ vs. $10,15 \pm 1,49$) foram superiores ($p < 0,05$) na CLV grande comparada à pequena, respectivamente. A largura vulvar foi um bom preditor da CFA e das concentrações de AMH em ambos os grupos genéticos. Os marcadores estudados tiveram efeito positivo sobre o número de oócitos viáveis, portanto, se mostraram viáveis para a seleção de doadoras nas condições deste experimento.

Palavras-chave: eficiência reprodutiva, genitália externa, marcador hormonal de fertilidade, bovinos.

Introdução

A seleção de fêmeas bovinas a partir de índices reprodutivos é pouco utilizada devido ao longo período para avaliação do desempenho das fêmeas e a baixa herdabilidade das características (Silva et al., 2005). A fertilidade das fêmeas é mensurada a partir de índices reprodutivos como idade ao primeiro parto e o intervalo de partos (Perotto et al., 2006). No entanto, tais índices sofrem ação de fatores não genéticos como a nutrição e o manejo (Zink et al., 2011). Sendo assim, a busca por características que possam indicar de forma indireta animais reprodutivamente superiores torna-se essencial.

O tamanho de estruturas reprodutivas pode influenciar a fertilidade de fêmeas bovinas. O tamanho ovariano é um bom preditor da reserva folicular e da funcionalidade ovariana (Ireland et al., 2008; Modina et al., 2013). A genitália externa (vulva) pode ser um preditor da reserva folicular ovariana e de medidas de fertilidade a campo como intervalo de partos e eficiência reprodutiva (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018). Entretanto, é preciso investigar fatores que possam influenciar o tamanho da genitália externa assim como as possíveis diferenças entre os grupos genéticos.

A reserva folicular ovariana em fêmeas vem sendo estimada a partir da contagem de folículos antrais (CFA) por ultrassonografia (Silva Santos et al., 2014). Não parece haver dúvidas

que a CFA influencia de forma positiva os resultados obtidos através das biotecnologias reprodutivas (Ireland et al., 2008; Santos et al., 2016). Entretanto, quando se avalia os resultados em relação aos índices de reprodução a campo, os dados ainda são controversos (Alvarez et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Cushman et al., 2009; Rodrigues et al., 2013; Santos et al., 2016; Maculan et al., 2018). Desta forma, mais estudos são necessários para avaliar a influência de características indicadoras de fertilidade (CFA, mensurações de genitália externa, tamanho ovariano) sobre o desempenho reprodutivo.

Outro marcador de fertilidade que vem sendo amplamente investigado em fêmeas é a concentração do hormônio anti-mulleriano (AMH). O AMH atua como modulador da atresia folicular sendo um indicador de maior reserva folicular ovariana (Monniaux et al., 2012). Entretanto, o efeito da concentração do AMH no desempenho reprodutivo ainda é pouco estudado.

Assim, os objetivos foram avaliar a influência das características ovarianas, genitais e das concentrações de AMH sobre os índices de fertilidade em fêmeas taurinas e zebuínas. Hipotetiza-se que as medidas do trato reprodutor sejam correlacionadas (maior largura vulvar vulvar, maior contagem folicular antral e maiores concentrações de AMH) e que fêmeas com maiores mensurações reprodutivas possuam melhor desempenho reprodutivo.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos e protocolos relacionados com animais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no uso de animais (Comissões Permanentes/PRP- UFLA) da Universidade Federal de Lavras- MG, Minas Gerais, Brasil com protocolo de nº 063/15.

Animais e instalações

Fêmeas *Bos Indicus* (raça Brahman, n=124) e *Bos Taurus* (raças Simental e Angus, n=155), originárias de uma propriedade particular localizada no município de Silvianópolis-MG foram utilizadas para identificar diferenças entre o grupo genético sobre a contagem folicular antral (CFA), largura vulvar e concentração de AMH. As fêmeas zebuínas possuíam idades entre 2 e 9 anos (média de $4,8 \pm 2,7$ anos) e pesos entre 317 a 774 kg (média $531,00 \pm 98,62$ kg). Já as fêmeas taurinas possuíam idades variando entre 2 e 16 anos (média de $5,7 \pm 3,2$ anos) e pesos entre 258 a 803 kg (média $533 \pm 95,72$ kg). Todas as fêmeas permaneceram em pastagem de

Brachiaria sp, com suplementação de silagem de milho, sal mineral *ad libitum* e ração concentrada a 1,5 % do peso corporal. O manejo reprodutivo consistiu de monta natural (MN) e inseminação artificial convencional (IA) ou em tempo fixo (IATF) sendo que, todas as fêmeas eram cíclicas e possuíam condição corporal entre 3 e 8 em uma escala de 1 a 9. Os animais foram classificados por paridade, sendo considerados dois grupos: N (nulíparas ou primíparas n=117) e V (multíparas, n=164).

Contagem folicular antral (CFA) e tamanho ovariano

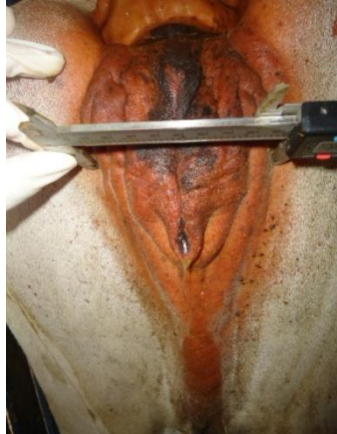
A contagem dos folículos antrais maiores ou iguais a 2mm de diâmetro de ambos os ovários foi realizada por ultrassonografia transvaginal (Aloka SSD 500) com sonda convexa de 5,0 MHz, envolvida com fita adesiva em torno do tubo de PVC e protegida com bainha plástica de silicone para OPU (Walmur®) em um dia aleatório do ciclo estral.

O tamanho ovariano foi estimado de forma subjetiva através de um escore fornecido pelo médico veterinário responsável pelos exames ultrassonográficos. Todas as fêmeas foram avaliadas pelo mesmo profissional tendo em vista que o escore se trata de uma avaliação subjetiva. Desta forma, os ovários foram classificados em P (pequeno, $\leq 2,5$ cm), M (médio, 2,5 a 3,5 cm) e G (grande, $\geq 3,5$ cm).

Morfometria da genitália externa

A morfometria da genitália externa foi medida em um dia aleatório do ciclo estral utilizando paquímetro digital (150 mm/0,01mm PowerfixNf, Digimess, São Paulo, BR), sendo que, a largura da vulva foi considerada a distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus (Figura 1) segundo metodologia descrita por Mesquita et al., 2016. Com base nas distribuições de frequência, as fêmeas foram classificadas de acordo com a largura vulvar em: grande ($G \geq 86$ mm) e pequena ($P < 86$ mm). O escore de condição corporal (1 a 9) foi registrado por um único avaliador com o intuito de verificar possíveis influências sobre o tamanho da genitália externa. Foram excluídas do estudo fêmeas com sinais de cio, no fim de gestação (30 dias para o parto) e fêmeas no pós-parto recente (menos de 20 dias de parida).

Figura 1. Largura vulvar medida com paquímetro digital.



Fonte: Mesquita et al., 2016.

Avaliação da eficiência reprodutiva

A eficiência reprodutiva foi avaliada a partir do histórico reprodutivo das fêmeas fornecido pela propriedade. As variáveis analisadas foram idade ao primeiro parto (IPP), intervalo do parto ao primeiro serviço (IPPS), intervalo de partos (IDP), número de serviços por concepção (SC) e número de óocitos viáveis (OV) nas fêmeas que eram submetidas à protocolos de aspiração folicular.

Amostragem de sangue e determinação de AMH

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção coccígea em tubos à vácuo de 10 mL (BD VACUTAINER®, São Paulo, BR) em um dia aleatório do ciclo estral. O soro foi obtido após centrifugação a 3000g por 15 min e mantido congelado a -20°C para posterior análise. As concentrações séricas de AMH foram determinadas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit; AnshLabs, Webster, Texas, EUA), previamente validado para bovinos (Ireland et al., 2008). Três ensaios foram realizados com sensibilidade de 0,011 ng / mL e variabilidade de 1,8 a 2,8 intra-ensaio e de 0,4 a 0,8 inter-ensaio. A partir das respectivas distribuições de frequências, os animais foram classificados como AMH baixo ($\leq 0,81$ ng/mL) e alto ($> 0,81$ ng/mL). Os ensaios foram conduzidos no laboratório IgAc (Instituto GENESE de coleções científicas, São Paulo, BR).

Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SAS[®] (Cary, NC, EUA, 2016). Foram criadas classes de largura vulvar e concentração do hormônio anti-Mülleriano baseadas nas respectivas distribuições de frequência. Os dados gerais foram testados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk de acordo com o procedimento UNIVARIATE, e quando necessário, transformados para atingir a normalidade. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para avaliar os efeitos de raça, escore de condição corporal, paridade, classe de largura vulvar, classe de AMH e interações sobre os valores de CFA, idade ao primeiro parto (IPP), intervalo parto ao primeiro serviço (IPPS), intervalo de partos (IDP), número de serviços por concepção (SC) e número médio de oócitos viáveis (OV). As variáveis foram submetidas ao teste de correlação pelo procedimento PROCORR. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas pelo teste de Tukey a $P < 0,05$.

Resultados

Contagem folicular antral

A CFA foi superior ($P < 0,0001$) nas fêmeas zebuínas ($36,30 \pm 1,34$) comparada às taurinas ($22,09 \pm 1,67$). A variação na contagem total foi de 4 a 119 nas fêmeas zebuínas e de 1 a 88 nas taurinas. A CFA foi correlacionada com a largura vulvar ($P < 0,0001$; $r = 0,16$) em ambos os grupos genéticos, sendo que, a largura vulvar foi maior em fêmeas na classe de CFA alta. Não houve efeito ($P = 0,19$) da idade sobre a CFA, independentemente das raças. Não houve ($P = 0,14$) influência da paridade das fêmeas sobre a CFA em ambos os grupos genéticos. O tamanho dos ovários não diferiu entre as raças, porém influenciou a CFA, sendo que esta foi mais alta em ovários grandes (Tabela 1). Não correlação ($P = 0,13$) entre a CFA e o ECC.

Tabela 1. Efeito do tamanho ovariano sobre a contagem folicular antral (CFA) em fêmeas bovinas.

TAMANHO OVARIANO	PEQUENO (<2,5cm)	MÉDIO (2,5-3,5cm)	GRANDE (>3,5cm)
	CFA	CFA	CFA
Direito	17,08±13,29 ^c (n=81)	29,30±18,60 ^b (n=132)	41,69±27,93 ^a (n=62)
	CFA	CFA	CFA
Esquerdo	20,20±14,15 ^c (n=121)	31,16±20,49 ^b (n=126)	52,34±32,74 ^a (n=26)

Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças (P <0,05). Números são médias dos quadrados mínimos ± erro padrão da média.

A CFA não influenciou (P>0,05) os índices reprodutivos IPP, IPPS, IDP, SC, mas foi positivamente correlacionada (P<0,0001) com a concentração de AMH (r=0,22) e com o número de oócitos viáveis (r=0,19).

Morfometria da genitália externa

A CFA da classe de largura vulvar grande (36,10±1,90) foi superior (P<0,0001) à classe pequena (22,78±1,64). Esse efeito principal se manteve quando avaliado de acordo com o grupo genético (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da classe de largura vulvar (CLV) sobre a contagem folicular antral (CFA) de acordo com o grupo genético.

	CLASSE DE LARGURA VULVAR (CLV)				
	GRANDE		PEQUENA		P
	N	CFA	N	CFA	
Taurino	11	29,27±5,18 ^a	144	21,53±1,46 ^b	<0,0001
Zebuíno	108	36,80±2,30 ^a	17	33,12±5,80 ^b	<0,0001

Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças (P <0,05). Números são médias dos quadrados mínimos ± erro padrão da média.

A largura vulvar foi superior (P<0,0001) nas fêmeas zebuínas (106,94±15,83cm) em comparação com as taurinas (69,78±14,11). A variação da largura vulvar foi de 35,15 a 99,24 nas fêmeas taurinas e de 67,67 a 143,37 nas zebuínas. A paridade influenciou (P<0,05) o tamanho da

genitália externa sendo que, a largura vulvar em novilhas foi menor ($81,01 \pm 2,17$, $n=115$) em relação às vacas ($90,11 \pm 1,81$, $n=165$). A idade não foi correlacionada com a largura vulvar ($P > 0,05$).

O tamanho ovariano foi associado com a largura vulvar sendo que, ovários maiores foram associados a maior largura vulvar (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da classe de tamanho ovariano (CTO) sobre a largura vulvar (mm).

OVÁRIO	CLASSE DE TAMANHO OVARIANO (CTO)			P
	PEQUENO	MÉDIO	GRANDE	
Direito	$78,12 \pm 2,56^c$ (n=82)	$88,51 \pm 2,02^b$ (n=132)	$92,70 \pm 2,90^a$ (n=64)	0,0012
Esquerdo	$82,02 \pm 2,12^c$ (n=121)	$87,41 \pm 2,08^b$ (n=126)	$99,16 \pm 4,41^a$ (n=28)	0,0044

Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

A concentração de AMH na classe grande ($n= 103$; $1,17 \pm 0,07$ ng/mL) de largura vulvar foi superior ($P < 0,0001$) à da classe pequena ($n= 119$; $0,49 \pm 0,07$ ng/mL). Entretanto, houve interação com o grupo genético sendo que, nas fêmeas taurinas esse efeito principal não se manteve (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da classe de largura vulvar (CLV) sobre as concentrações do hormônio anti-Mülleriano (AMH) de acordo com o grupo genético.

CLV	GRUPO GENÉTICO	
	ZEBUÍNO	TAURINO
Grande	$1,23 \pm 0,09^a$ (n=108)	$0,39 \pm 0,02^a$ (n=11)
Pequena	$0,89 \pm 0,02^b$ (n=17)	$0,43 \pm 0,05^a$ (n=144)

Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

O número de óocitos viáveis foi maior ($P<0,05$) nas fêmeas da classe de largura vulvar grande ($18,86\pm 1,76$; $n=38$) comparada à classe pequena ($10,15\pm 1,49$; $n=53$).

A largura vulvar não foi correlacionada ($P>0,05$) com os índices reprodutivos IPP, IPPS, IDP e SC.

Hormônio Antimulleriano (AMH)

A concentração de AMH nas fêmeas zebuínas foi superior ($P<0,0001$) às taurinas ($1,18\pm 0,07$ ng/mL, $n=112$; $0,42\pm 0,05$ ng/mL, $n=110$; respectivamente).

A concentração de AMH não diminuiu com a idade independente do grupo genético ($P>0,05$). Não houve efeito da paridade sobre as concentrações de AMH em ambos os grupos genéticos ($P=0,84$). O ECC não afetou as concentrações de AMH em ambos os grupos genéticos ($P>0,05$). A concentração de AMH em ambos os grupos genéticos foi mais alta na classe de ovários grandes (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da classe de tamanho ovariano (CTO) sobre as concentrações de AMH (ng/mL) em taurinos e zebuínos.

GRUPO GENÉTICO								
ZEBUÍNO				TAURINO				
CTO	OD	N	OE	N	OD	N	OE	N
Pequeno	$1,02\pm 0,02^c$	31	$1,06\pm 0,01^b$	50	$0,29\pm 0,01^c$	51	$0,36\pm 0,07^b$	71
Médio	$1,25\pm 0,02^b$	63	$1,04\pm 0,01^b$	58	$0,36\pm 0,09^b$	69	$0,53\pm 0,07^a$	68
Grande	$1,45\pm 0,03^a$	31	$2,17\pm 0,02^a$	15	$0,68\pm 0,01^a$	33	$0,43\pm 0,02^b$	13

OD: Ovário direito; **OE:** Ovário esquerdo. Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P<0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Não foi observada associação entre as concentrações de AMH e índices reprodutivos ($P>0,05$).

A contagem folicular antral nas fêmeas classificadas com AMH alto foi superior ($34,54\pm 1,84$) à observada nas fêmeas com AMH baixo ($23,08\pm 1,74$) ($P<0,0001$). Entretanto,

houve interação entre grupos genéticos sendo que, esse efeito principal se manteve apenas nas fêmeas zebuínas (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da classe de AMH sobre a contagem folicular antral (CFA) em fêmeas taurinas e zebuínas.

CLASSE DE AMH	N	ZEBUÍNO		TAURINO		
		CFA	P	N	CFA	P
AMH Alto	78	40,81±2,60 ^a	0,003	52	25,13±2,39 ^a	0,11
AMH Baixo	46	28,65±3,40 ^b		99	20,49±1,73 ^a	

Na mesma coluna, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Houve associação entre as concentrações de AMH e o número de oócitos viáveis nas fêmeas zebuínas ($P=0,0007$, $r=0,32$) e taurinas ($P=0,021$; $r=0,14$).

Discussão

A contagem folicular antral nas fêmeas zebuínas foi superior às fêmeas taurinas corroborando com a maioria dos estudos disponíveis na literatura. Segundo Alvarez et al. (2000), vacas da raça Brahman possuem maior CFA que vacas da raça Senepol. Batista et al. (2014) observaram variações na CFA em novilhas Nelore entre 18 a 85 folículos enquanto nas Holandesas, essa variação foi de 8 a 51. No presente estudo, esta variação foi de 4 a 119 nas fêmeas zebuínas e de 1 a 88 nas taurinas. A partir da CFA, é possível classificar as fêmeas de acordo com as respectivas distribuições de frequências. Segundo Ireland et al. (2008) e Burns et al. (2005), fêmeas de baixa CFA possuem menos que 15 folículos em ambos os ovários, as médias entre 15 a 25 e alta maior que 25. Entretanto, essa classificação deve ser baseada nas respectivas distribuições de frequências tendo em vista as diferenças fisiológicas observadas em fêmeas zebuínas e taurinas. Rodrigues et al. (2015) classificou fêmeas Nelores como: baixa ≤ 32 folículos, média entre 32 e 48 e alta ≥ 48 . Maculan et al. (2018) utilizaram como classificação para fêmeas Tabapuã: baixa < 28 , intermediária entre 28 e 50 e alta > 50 .

A largura vulvar em fêmeas zebuínas e taurinas foi associada à CFA corroborando com os trabalhos encontrados na literatura. Os tamanhos da rima e da largura vulvar relativos ao tamanho corporal das fêmeas foi indicativo de CFA mais alta em vacas Tabapuã (Mesquita et al., 2016).

Corroborando com estes dados, Maculan et al. (2018) observaram que fêmeas Tabapuã classificadas com alta CFA (>50) tinham maior largura vulvar em comparação com as da classe média (≥ 28 e ≤ 50) e baixa (< 28). Não foram encontrados na literatura observações dessa associação em fêmeas taurinas. Como a CFA reflete a reserva dos folículos ovarianos, pode-se prever que a idade influencia negativamente a CFA (Burns et al., 2005; Cushman et al., 2009). Sendo assim, a CFA de novilhas com idades semelhantes pode ser um indicativo mais inequívoco do futuro potencial reprodutivo. Em fêmeas Tabapuã com idades superiores à 14 anos, a CFA foi mais baixa quando comparada às fêmeas mais jovens (Maculan et al., 2018). Segundo Cushman et al. (2009), a CFA aumenta até os 5 anos de idade declinando em seguida. Em outro estudo, foi observada melhor competência de oócitos recuperados através de folículos antrais por OPU em vacas jovens (12 meses) e de meia-idade (7-8 anos) quando comparada com vacas velhas (≥ 15 anos) (Su et al., 2012). Martinez et al. (2015) observaram aumento da CFA em vacas Jersey e Holandesa até 10 anos. No presente estudo não foi observada associação entre a CFA e a idade das fêmeas independentemente do grupo genético. Esse fato pode ser explicado pela baixa idade das fêmeas sendo que, foram incluídas no estudo poucas fêmeas com idade superior a 10 anos.

A paridade das fêmeas não afetou a CFA em ambos os grupos genéticos. Maculan et al. (2018) não observaram diferenças entre a CFA em fêmeas nulíparas ($38,6 \pm 23,96$), primíparas ($47,54 \pm 26,16$) e múltíparas ($41,08 \pm 25,54$).

O tamanho ovariano foi associado à CFA. Cushman et al. (2009) relataram correlação baixa ($r=0,05$; $P=0,007$), porém positiva entre o peso ao nascer, peso do ovário e CFA em novilhas neonatais que se mantém até à maturidade reprodutiva. Modina et al. (2013) mostraram redução significativa no peso, comprimento e largura ($5,07 \pm 0,28$ g; $3,82 \pm 0,10$ cm e $1,79 \pm 0,06$ cm, respectivamente) de ovários com baixa ($4,51 \pm 0,32$) comparados aos ovários com alta ($31,93 \pm 1,67$) CFA ($13,29 \pm 0,68$ g; $4,67 \pm 0,09$ cm e $2,69 \pm 0,06$ cm; $P < 0,001$, respectivamente). De forma semelhante, Ireland et al. (2008) observaram que, o peso, o comprimento e a altura ($3,05 \pm 0,33$ g; $23,3 \pm 1,4$ e $12,3 \pm 1,1$ mm; $P < 0,05$, respectivamente) dos ovários de animais com baixa CFA (≤ 15) foram menores ($P < 0,05$) em animais classificados com alta CFA (≥ 25) ($7,11 \pm 0,41$ g; $P < 0,0001$; $28,3 \pm 1,3$ e $15,5 \pm 0,8$ mm; $P < 0,05$, respectivamente). Além disso, a variação entre os animais nas classes de CFA durante as ondas foliculares foi positivamente correlacionada ($r=0,80-0,90$; $P < 0,01$) com variação no peso ovariano e número total de folículos (Ireland et al., 2008). Ireland et al. (2011) demonstraram que fêmeas da raça Holandesa que

possuíram maior volume ovariano apresentaram maior número de folículos antrais sendo dados semelhantes reportados por Eborn et al. (2013) em novilhas Angus. Outro estudo mostrou correlação positiva ($P < 0,01$) do volume ovariano com o número de oócitos recuperados, maduros, fertilizáveis e o total de embriões ($r = 0,75$; $r = 0,63$; $r = 0,56$ e $r = 0,54$, respectivamente; Mercé et al., 2006). Mesquita et al. (2016) classificou o volume ovariano como pequeno ($\leq 7 \text{ mm}^3$), médio ($7-11 \text{ mm}^3$) e grande ($> 11 \text{ mm}^3$) e analisou a qualidade dos CCOs. A qualidade dos CCOs no grupo com ovários de volume médio ($3,19 \pm 0,08$) foi superior ($P < 0,05$) ao pequeno ($2,96 \pm 0,08$) e grande ($2,95 \pm 0,09$).

A CFA está relacionada às várias mensurações de fertilidade sendo que os resultados observados em relação à reprodução são promissores. No presente estudo, a CFA foi associada com maior número de oócitos viáveis em ambos os grupos genéticos. Na produção *in vitro* de embriões (PIVE), estudos demonstram que a maior CFA foi relacionada com maior número de embriões produzidos (Ireland et al., 2007). Santos (2013) concluíram que o número de oócitos viáveis foram maiores em vacas Nelore com alta CFA, além de maiores taxas de clivagem, blastocistos e proporção de embriões vitrificáveis em comparação com fêmeas de CFA intermediária e baixa. Alvarez et al. (2000) verificaram que a baixa CFA foi associada com redução da taxa de prenhez em novilhas devido à baixa competência de produção de embriões. Segundo Oliveira et al. (2002), vacas que apresentam maior CFA possuem menor intervalo de parto. Resultados similares relacionados à fertilidade também foram encontrados por Cushman et al. (2009) em que novilhas mestiças com alta CFA (≥ 25) possuíram maior taxa de prenhez que as de baixa (≤ 15) ($94,3 \pm 2,3$ vs. $85,5 \pm 3,4$, respectivamente). Em fêmeas Tabapuã ($n = 591$), a maior contagem folicular antral foi correlacionada ($r = -0,17$; $P = 0,006$) com menores intervalos de partos (Maculan et al., 2018). Contrariamente aos autores citados acima, Rodrigues et al. (2013) não observaram diferenças nas taxas de concepção de fêmeas da raça Nelore submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de acordo com a CFA. Em um estudo recente com vacas Nelore, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de concepção entre vacas com baixa, intermediária e alta CFA (58,6; 48,6 e 51,9%, respectivamente; Santos et al., 2016). No presente estudo, a CFA não foi associada com índices de reprodução a campo como idade ao primeiro parto, intervalo de parto, número de serviços por concepção e dias do parto ao primeiro serviço. Esse fato pode ser explicado pelos vários fatores ambientais (nutrição, efeito do touro

e/ou inseminação, instalações, dentre outros) que podem interferir nos índices reprodutivos mascarando o potencial reprodutivo de origem genética.

A CFA foi maior em fêmeas zebuínas classificadas com alto AMH. Essa associação é bem elucidada na literatura (Rico et al., 2009; Ireland et al., 2010; Batista et al., 2014; Souza et al., 2016; Maculan et al., 2018), entretanto, essa relação não se manteve nas fêmeas taurinas no presente estudo. Os valores de CFA e das concentrações de AMH são bem variáveis sendo que a CFA e a concentração de AMH foi maior em fêmeas zebuínas. Corroborando esses achados, Batista et al. (2014) observaram maior número de folículos e maior concentração de AMH em fêmeas *Bos indicus* do que em fêmeas *Bos taurus*.

A largura vulvar das fêmeas zebuínas foi superior às taurinas. Mesquita et al. (2016) classificaram medidas de fêmeas da raça Tapabuã em grande ($>7,5$ cm), média (>5 e $\leq 7,5$ cm) e pequena (≤ 5 cm). Inexistem dados na literatura que relatam a largura vulvar em fêmeas taurinas. No presente estudo, foram observadas variações na largura vulvar de 35,15 a 99,24 mm nas fêmeas taurinas e de 67,67 a 143,37 mm nas zebuínas. A largura da vulva e o comprimento da rima em fêmeas Tabapuã variaram de 4,20 a 17,07 cm (média: $8,57 \pm 1,72$ cm) e 4,85 a 17,79 cm (média: $9,80 \pm 0,18$ cm), respectivamente (Maculan et al., 2018). Apesar dos poucos relatos na literatura sobre a mensuração da genitália externa, a raça Brahman parece possuir maior largura vulvar comparativamente a raça Tabapuã. Desta forma, parece haver grande variação nessa medida entre animais de diferentes raças zebuínas sendo assim, é importante frisar a utilização de tal mensuração dentre as raças. Segundo Maculan et al. (2018), o comprimento de rima vulvar foi menor ($P < 0,001$) em nulíparas em comparação com vacas primíparas e múltíparas, entretanto, não houve efeito da paridade sobre a largura da vulva. No presente estudo, a largura vulvar em fêmeas nuíparas e primíparas foi inferior às múltíparas.

Fêmeas classificadas com maior largura vulvar obtiveram maior CFA. A largura vulvar foi maior ($P=0,05$) em fêmeas de classe com alta CFA ($8,81 \pm 0,12$ cm) comparada com média e baixa largura vulvar ($8,42 \pm 0,11$ cm e $8,38 \pm 0,13$ cm; Maculan et al., 2018). A CFA foi maior ($P=0,0001$) em fêmeas com maior largura vulvar relativa comparada com menor largura vulvar ($20,08 \pm 1,36$ e $11,16 \pm 1,60$, respectivamente) (Mesquita et al., 2016).

A idade não foi correlacionada com a largura vulvar em ambos os grupos genéticos e ovários maiores foram associados à maior largura vulvar. Entretanto, considerando que a paridade exerce efeito sobre a largura vulvar, a mensuração da genitália em novilhas pode ser o meio mais

seguro para selecionar fêmeas de maior potencial reprodutivo a partir de mensurações genitais. Ovários maiores foram associados à maior largura vulvar. Inexistem dados na literatura que associaram tais características.

A largura vulvar foi superior nas fêmeas zebuínas que possuíram maior concentração de AMH. Maculan et al. (2018) não observaram associação entre as medidas vulvares e a concentração de AMH sendo este o único relato encontrado na literatura.

A largura vulvar foi correlacionada com o número de oócitos viáveis, entretanto, não foi observada associação com os índices de reprodução a campo (IPP, IPPS, IDP e SC). Maculan et al. (2018) observaram correlação negativa entre largura vulvar e intervalo de partos ($r = -0.1547$; $P < 0,005$).

A concentração de AMH em fêmeas zebuínas foi superior às taurinas. Em novilhas Nelore a concentração de AMH foi $1,4 \pm 0,4$ ng / mL (Guerreiro et al., 2014) enquanto em novilhas Angus e Charolês a concentração foi de 0,042 e 0,054 ng / mL (Pfeiffer et al., 2014). Batista et al., 2014 também observaram maiores concentrações de AMH em fêmeas zebuínas em comparação às taurinas. As concentrações de AMH e CFA foram maiores em Gir (0,6 ng / mL e 60,0 respectivamente) quando comparadas com Holsteins (0,24 ng / mL e 35,9 respectivamente) e Búfalo (0,18 e 25,6 respectivamente) da raça Murrah (Baldrighi et al., 2014). Stojšin-Carter et al. (2016) avaliaram as concentrações de hormônio anti-Mülleriano no plasma em fêmeas zebuínas e taurinas e observaram maiores valores de AMH em animais zebu ($0,77 \pm 0,99$) e mestiços ($0,63 \pm 0,07$) quando comparados ao europeu ($0,33 \pm 0,24$).

Fêmeas classificadas como alto AMH possuíram maior CFA. Esse achado corrobora com a maioria dos trabalhos publicados na literatura (Ireland et al., 2008; Rico et al., 2011; Monniaux et al., 2012; Batista et al., 2014, Maculan et al., 2018). O AMH inibe a produção e a sensibilidade folicular ao FSH reduzindo então a atresia folicular (Ireland et al., 2009). Desta forma, fêmeas zebuínas, mesmo não possuindo maior número de folículos pré-antrais em relação aos animais taurinos, a CFA torna-se superior devido às maiores concentrações de AMH circulantes (Silva Santos et al., 2011; Batista et al., 2014).

Houve uma associação entre as concentrações de AMH e o número de oócitos viáveis, entretanto, não foi observada associação com os índices de reprodução a campo. Rico et al. (2009) que observaram maiores concentrações de AMH em novilhas *Bos taurus* com maior atividade ovariana. A concentração de AMH foi positivamente associada com a taxa de

concepção ao primeiro serviço (Ribeiro et al., 2014). No mesmo estudo, a concentração de AMH foi relacionada negativamente com o número de prenhez/inseminação somente quando a detecção de cio foi realizada. Quando a ovulação foi sincronizada para IATF, essa mesma relação com o AMH não foi observada. Santos et al. (2014) não detectaram relação entre a concentração de AMH e a taxa de concepção em protocolos de IATF em vacas Nelore. Além disso, não se observou efeito da população folicular antral de doadoras no estabelecimento da prenhez após a transferência dos embriões produzidos (Bragança et al., 2014). Esse resultado demonstra que a maior produção oocitária não implica em perda de capacidade produtiva de gametas viáveis. Maculan et al. (2018) não observaram associação entre as concentrações de AMH e índices reprodutivos (idade ao primeiro parto, intervalo de partos) em vacas e novilhas da raça Tabapuã. Ainda não há uma consolidação de uma relação entre as concentrações de AMH e os índices reprodutivos. Esse fato se deve ao grande número de fatores não genéticos que podem influenciar a reprodução das fêmeas.

Conclusões

A largura vulvar foi um bom preditor da CFA e das concentrações de AMH em ambos os grupos genéticos. As características ovarianas, genitais e hormonais foram positivamente associadas com o número de oócitos viáveis. A largura vulvar, CFA e AMH podem ser utilizadas em modelos destinados à seleção de fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* para superioridade reprodutiva.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada e financiada pela Casa Branca Agropastoril, Silvianópolis-MG em parceria com o Instituto GENESE de coleções científicas, São Paulo, BR. Não houve conflito de interesses que pudesse ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Referências

Alvarez, P., Spicer, L.J., Chase, C.C. Jr., Payton, M.E., Hamilton, T.D., Stewart, R.E., Hammond, A.C., Olson, T.A., Wettemann, R.P., 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.* 78 (5), 1291-1302.

- Baldrighi, J.M., SáFilho, M.F., Batista, E.O., Lopes, R.N., Visintin, J.A., Baruselli, P.S., Assumpção, M.E., 2014. anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murrh heifers compared to holstein and gyr kept under the same management. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 1015–1020.
- Batista, E.O.S., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M., SáFilho, M.F., Del Valle, T.A., Jesus, E.F., Lopes, R., Rennó, F.P., Baruselli, P.S., 2014. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod.Domest. Anim.* 49, 448-452.
- Bragança, L.G.M., Marques, K.N.G., Vieira, L.M., Silveira, C.R.A., Picado, L.G., Monteiro, B.M., Sá Filho, M.F., Baruselli, P.S., 2014. The number of oocytes recovered from Holstein donors has no effect on the pregnancy establishment of in vitro embryo programs. *Anim. Reprod.* 11, 433 (abstract).
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F.J., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C., 2009. 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. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980.
- Eborn, D.R., Cushman, R.A., Echternkamp, S.E., 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. *J Anim. Sci.* 91, 4168-4179.
- Guerreiro, B.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., SáFilho, M.F., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Silveira, C.R.A., Bayeux, B.M., Dias, E.A.R., Monteiro, F.M., Accorsi, M., Lopes, R. N.V.R., Baruselli, P.S., 2014. Plasma antimullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest. Anim.Endocrinol.* 49, 96-104.
- Ireland, J.J., Scheetz, D., Jimenez, F., Folger, J.K., Smith, G.W., Mossa, F., Evans, A.C.O., 2010. Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters. In '43rd Annual Meeting for

- the Society for Study of Reproduction'. Society for Study of Reproduction/HighWire Press: Milwaukee, USA.
- Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225.
- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Develop.* 23, 1–14.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human. Reprod.* 22 (6), 1687–1695.
- Maculan, R., Pinto, T.L.C., Moreira, G.M., Vasconcelos, G.L., Sanches, J.A., Rosa, R.G., Bonfim, R.R., Gonçalves, T.M., Souza, J.C., 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Ani.Reprod. Sci.* 189, 84–92.
- Martinez, F.M., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L., 2015. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 1–10.
- Mercé, L.T., Bau, S., Barco, M.J., Troyano, J., Gay, R., Sotos, F., Villa, A., 2006. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum.Reprod.* 21,1218-26.
- Mesquita, N.F., Maculan, R., Maciel, L.F.S., Alves, N., De Carvalho, R.R., Moreira, G.M, De Souza, J.C., 2016. Vulvar width and rimalenght as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. *J. Reprod. Develop.* 62 (6), 587-590.

- Modina, S.C., Tessaro, I., Lodde, V., Franciosi, F., Corbani, D., Luciano, A.M., 2013. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 235-244.
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J.-L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Fabre, S., 2012. Regulation of antiMüllerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 1–16.
- Oliveira, J., Neves, J., Moraes, J., Gonçalves, P., Bahr, J., Hernandez, A., Costa, L., 2002. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 1-10.
- Perotto, D., Abrahão, J.J.S., Kroetz, I.A., 2006. Intervalo de partos de fêmeas bovinas nelore, guzerá x nelore, red angus x nelore, marchigiana x nelore e simental x nelore. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 733-741.
- Pfeiffer, K.E., Jury, L.J., Larson, J.E., 2014. Determination of Anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 46, 58–64.
- Ribeiro, E.S., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2014. Plasma anti-müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J. Dairy Sci.* 97, 6888–6900.
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J., Monniaux, D., 2009. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59.
- Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., Monniaux, D., 2011. Regulation of Anti-Müllerian hormone production in the cows: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol. Reprod.* 84, 560–571.
- Rodrigues, A.S., Oliveira, S.N., Loiola, M.V.G., Andrade, B.H.A., Ferraz, P.A., Ayres, M.C.C., Bittencourt, R.F., Chalhoub, M., Filho, A.L.R., 2013. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. *Pesq. Agrop. Bras.* 48 (7), 801-804.
- Rodrigues, A.S., Oliveira, S.N., Loiola, M.V.G., Ferraz, P.A., Chalhoub, M., Bittencourt, R.F., Araujo, E.A.B., Bittencourt, T.C.B.S.C., Filho, A.L.R., 2015. Contagem de folículos antrais

- em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Ciência Rural*. 45 (4), 711-717.
- Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Blaschi, W., Morotti, F., Silva, C.B., Moraes, F.L.Z., Giudicissi, D.P.L., Seneda, M.M., 2013. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim. Reprod.* 10, 451. (abstract).
- Santos, G.M.G.D., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches, B.V, de Moraes, F.L.Z., Blaschi, W., Seneda, M.M., 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 165, 17-21.
- Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches, B.V., Moraes, F.L.Z., Blaschi, W., Seneda, M.M., 2014. High numbers of antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in Nelore cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 206-206.
- Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Santos, G.M.G., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M., 2014. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 48–51.
- Silva-Santos, K. C., Siloto, L.S., Santos, G.M., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M., 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*. 76, 1051-1057,
- Silva, J.A., Dias, L.T., Albuquerque, L.G. 2005. Estudo Genético da Precocidade Sexual de Novilhas em um Rebanho Nelore. *Rev. Bras. Zoot.* 34 (5), 1568-1572.
- Stojšin-Carter, A., Mahboubi, K., Costa, N.N., Gillis, D.J., Carter, T.F., Neal, M.S., Miranda, M.S., Ohashi, O.M., Favetta, L.A., King, W. A 2016. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 167, 51-58.
- Souza, J.C., Maculan, R., Rosa, R.G., Smith, L.F., Casas, P.S., Faria, B.R.M., Alves, N., Gonçalves, T.M. 2016. Antral follicle counts, vulva width, and serum anti-mullerian hormone concentrations in bovine females of the Tabapuã breed. *Reprod. Fertil. Dev.* 195 (abstract).

- Su, L., Yang, S., He, X., Li, X., Ma, J., Wang, Y., Presicce, G.A., Ji, W. 2012. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by Ovum Pick Up. *Reprod.Domest. Anim.* 47 (2), 184–189.
- Zink, V., Štípková, M., and Lassen, J. 2011. Genetic parameters for female fertility, locomotion, body condition score, and linear type traits in Czech Holstein cattle. *J DairySci.* 94, 5176-5182.

ARTIGO 2

CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO (AMH) COMO PREDITOR DA PUBERDADE EM MACHOS DAS RAÇAS BRAHMAN E SIMENTAL

Artigo formatado segundo as normas da revista *Animal Reproduction Science*

Concentração do hormônio anti-mülleriano (AMH) como preditor da puberdade em machos das raças Brahman e Simental

R. Maculan^a, G. L. Vasconcelos^a, Gabriel Miranda Moreira^a, Jesús Alfonso Sánchez Viafara^a, Cintia Vanin^a, Nathalia Alves^a, Marcos Brandão Dias Ferreira^b, José Camisão de Souza^a

^aAnimal Science Department, Federal University of Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

^bEPAMIG - Agricultural Research Company of Minas Gerais, CEP 31170-495, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding address (J. C. Souza): Animal Science Department, Federal University of Lavras, Câmpus Universitário, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil, Caixa Postal 3037.

Phone/Fax: +55 35 3829-1231 [jcamisao@yahoo.com.br]

Resumo

O objetivo foi avaliar se a circunferência escrotal (CE) e ou a concentração de AMH no período da pré-puberdade, são indicativos de precocidade sexual em touros Brahman e Simental. Foram utilizados 53 tourinhos Brahman (n=27) e Simental (n=26) com idade de 20-22 meses e 9-18 meses, respectivamente. A CE foi mensurada em três períodos (pré-puberal, puberal e pós-puberal). A concentração de AMH foi mensurada na pré-puberdade e os animais foram classificados em AMH baixo (<2,28 ng/mL) e alto (≥2,28 ng/mL). A CE foi negativamente correlacionada com a porcentagem de defeitos totais (r = -0,60; P = 0,0246). A CE foi superior (P = 0,0002) nos animais da classe de AMH baixo (34,78±78) em comparação com AMH alto (32,47±0,42). Machos classificados como baixo AMH obtiveram melhores (P < 0,05) resultados no exame andrológico (vigor: 3,92±0,20; turbilhonamento: 2,63±0,19; motilidade progressiva: 77,55±3,80) quando comparados aos de alto AMH (vigor: 3,33±0,19; turbilhonamento:

2,06±0,19; motilidade progressiva: 65,14±3,79). Pode-se concluir que a concentração de AMH associada com a CE no período da pré-puberdade foram bons preditores da precocidade sexual em touros das raças Brahman e Simental.

Palavras-chave: AMH, precocidade sexual, qualidade seminal, seleção para precocidade.

Introdução

A seleção de touros para reprodução, seja do ponto de vista andrológico ou do melhoramento genético, colabora com o aumento do potencial fértil do reprodutor garantindo a maior vida útil no rebanho e a disseminação de características desejáveis para seus descendentes de forma eficiente. Desta forma, a busca por características que possam indicar precocemente o potencial reprodutivo dos touros é de suma importância para o sucesso e a velocidade do melhoramento genético. A circunferência escrotal (CE) destaca-se por ser de fácil mensuração, alta herdabilidade e repetibilidade além de possuir correlação positiva com características qualitativas e quantitativas do sêmen, peso corporal e idade à puberdade de machos e fêmeas (Kastelic, 2014). Além disso, também pode ser indicativo de maior precocidade sexual (Freneau et al., 2006).

Outro marcador de puberdade que vem sendo analisado é o hormônio anti-Mülleriano (AMH). O AMH é uma glicoproteína secretada pelas células de Sertoli presentes nos testículos. É sabido que durante a puberdade, a expressão do AMH é negativamente regulada por hormônios androgênicos como a testosterona, e diminui drasticamente nos túbulos seminíferos (Okay, 2003). A expressão reduzida de AMH está intimamente relacionada com o aparecimento da espermatogênese nos túbulos seminíferos (Almeida et al., 2012). Desta forma, o AMH pode ser um marcador eficiente da precocidade sexual possibilitando a seleção de touros antes destes entrarem em idade reprodutiva. Hipotetiza-se que concentrações baixas de AMH e CE mais alta no período pré-puberal são indicativos de precocidade sexual em touros jovens zebuínos (Brahman) e taurinos (Simental).

Materiais e métodos

Todos os procedimentos e protocolos relacionados com animais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no uso de animais (Comissões Permanentes/PRP- UFLA) da Universidade Federal de Lavras- MG, Minas Gerais, Brasil com protocolo de nº 064/18.

Animais e instalações

Foram utilizados 53 tourinhos, sendo 27 animais da raça Brahman (*Bos taurus indicus*) entre 20 e 22 meses e 26 da raça Simental (*Bos taurus taurus*) entre 9 e 18 meses oriundos de uma propriedade particular localizada na cidade de Silvianópolis-MG. Os animais foram criados em uma mesma área em sistema de pastejo com suplementação diária a base de silagem de milho e concentrado até o momento das coletas de dados.

Circunferência escrotal

A circunferência escrotal (CE) foi mensurada no período pré-puberal (20 meses para os animais Brahman e 9 meses para os Simental), puberal (22 meses para os Brahman e 18 meses para os Simental) e pós-puberal (30 a 35 meses para os Brahman e 22 a 26 para os Simental). A obtenção da CE foi realizada com a utilização de fita métrica flexível, mensurando-se na região de maior largura aparente do escroto após leve tração ventro-caudal das gônadas para o fim do escroto.

Avaliação andrológica

Coletas trimestrais foram realizadas para determinar o momento do início da incidência de puberdade em ambas as raças. Foram considerados animais púberes quando possuíram um ejaculado com no mínimo 10% de motilidade e concentração de 50×10^6 segundo metodologia proposta por Wolf et al (1965). Nos animais Brahman, foram observados animais púberes a partir dos 22 meses enquanto nos animais Simental a partir dos 18 meses. Foram utilizados dados de duas coletas sendo uma no período da incidência da puberdade (22 meses para os Brahman e 18 meses para os Simental) e uma em estágio aleatório da maturidade sexual (30 a 35 meses para os Brahman e 22 a 26 meses para os Simental). As coletas foram realizadas utilizando o método de eletroejaculação. Os parâmetros foram avaliados com auxílio de um microscópio em aumento de 10x, avaliando o turbilhonamento (movimento espermático em massa numa escala de 0 – 5).

Após isso, foi introduzida uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C e com aumento de 400x, onde avaliou-se a motilidade espermática progressiva retilínea (%) e o vigor espermático (0 – 5) (CBRA, 1998).

Com utilização de um tubo contendo 1mL de solução de formol-salina tamponada (Hancoch, 1957), foram acondicionadas alíquotas do ejaculado suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1250x (sob uma gota de óleo de imersão). Foram então contabilizadas, pelo mesmo técnico, 400 células por ejaculado, determinando-se o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) e classificados em defeitos espermáticos maiores (DEFM), menores (DEFMEN) e totais (DEFT), conforme os critérios classificados por Blom (1973).

Amostragem de sangue e determinação de AMH

Uma única amostra de sangue foi coletada no período da pré-puberdade sendo que, a idade média da coleta foi de 20 meses para os Brahman e 9 meses para os Simental. As amostras foram coletadas por venopunção coccígea em tubos à vácuo de 10 mL (BD VACUTAINER®, São Paulo, BR). O soro foi obtido após centrifugação a 3000g por 15 min e mantido congelado a -20°C para posterior análise. As concentrações séricas de AMH foram determinadas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit; Ansh Labs, Webster, Texas, EUA), previamente validado para bovinos (Ireland et al., 2008). Um ensaio foi realizado com sensibilidade de 0,011 ng / mL e variabilidade de 1,8 a 2,8 intra-ensaio. Os ensaios foram conduzidos no laboratório IgAc (Instituto GENESE de coleções científicas, São Paulo, BR). A partir da distribuição de frequência das concentrações de AMH, foram criadas classes sendo: AMH baixo <2,28ng/mL; AMH alto \geq 2,28ng/mL.

Estatística

Todas as análises foram realizadas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram submetidos a análise de variância como medidas repetidas em modelo misto, após testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homocedasticidade, onde os efeitos fixos de classe de AMH (Baixo <2,28 ng/mL e alto \geq 2,28 ng/m), período, raça e interações foram

avaliados sobre os dados de qualidade seminal e de CE. O termo de erro foi o efeito aleatório de animal dentro de raça. As variáveis dependentes foram: circunferência escrotal (CE), turbilhão, vigor, volume, concentração, motilidade progressiva, defeitos maiores, menores e totais e normais. As variáveis foram submetidas ao teste de correlação de Pearson pelo procedimento PROC CORR. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

Resultados

Circunferência escrotal

A CE nos animais da raça Brahman na pré-puberdade (20 meses) foi de $28,90 \pm 3,48$ cm ($n=27$) enquanto na puberdade (22 meses) a média foi de $32,24 \pm 3,40$ cm. Na raça Simental, a CE no período da pré-puberdade (9 meses) foi de $24,46 \pm 2,85$ ($n=26$) enquanto na puberdade (18 meses) a média foi de $36,57 \pm 3,45$. A CE foi negativamente correlacionada com a porcentagem de defeitos totais ($r=-0,5957$; $P=0,0246$) e positivamente com a porcentagem de espermatozoides normais ($r=0,595$; $P=0,0265$). Houve uma alta correlação entre os períodos de avaliação da CE (pré puberdade, puberdade e maturidade sexual) em ambas as raças (Brahman: $r=0,8776$; $P=0,0005$; Simental: $0,7483$; $P=0,0002$) mostrando assim a alta repetibilidade da medida. A CE na puberdade foi superior ($P=0,0002$) para os animais da classe de AMH baixo ($34,78 \pm 0,78$) em comparação com o alto ($32,47 \pm 0,42$).

Avaliação andrológica

Os parâmetros físicos (volume, vigor, motilidade progressiva, turbilhonamento) e morfológicos (porcentagem de defeitos maiores e de espermatozoides normais) diferiram entre as raças sendo que melhores resultados foram observados nos animais taurinos (Tab.1).

Tabela 1. Efeito da raça sobre os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen em touros das raças Brahman e Simental na idade à puberdade.

PARÂMETROS	BRAHMAN (n=27)	SIMENTAL (n=26)	P
Volume	4,91±0,52 ^a	7,31±0,55 ^b	0,0021
Vigor (1-5)	2,66±0,19 ^a	4,60±0,20 ^b	<0,0001
Concentração (10⁶)	366,51±35,68 ^a	646,03±39,46 ^b	<0,0001
Motilidade progressiva (%)	52,99±3,69 ^a	89,70±3,90 ^b	<0,0001
Turbilhonamento (1-5)	1,19±0,18 ^a	3,50±0,19 ^b	<0,0001
Defeitos maiores (%)	7,84±1,47 ^a	12,79±1,55 ^b	0,0227
Espermatozoides normais (%)	57,55±3,80 ^a	74,55±4,02 ^b	0,0028

Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças (P <0,05). Números são médias dos quadrados mínimos ± erro padrão da média.

O período de avaliação (puberdade e maturidade sexual) influenciou os parâmetros seminais sendo que, ao atingir a maturidade sexual possuíram melhor qualidade seminal (Tab.2).

Tabela 2. Efeito do período reprodutivo sobre os parâmetros seminais em touros das raças Brahman e Simental.

PARÂMETROS	PUBERDADE	MATURIDADE E SEXUAL	P
Volume	4,47±0,50 ^a	7,75±0,57 ^b	0,0021
Vigor (1-5)	3,00±0,18 ^a	4,24±0,21 ^b	<0,0001
Concentração (10⁶)	329,12±35,16 ^a	683,42±39,72 ^b	<0,0001
Motilidade progressiva (%)	60,81±3,54 ^a	81,88±4,04 ^b	0,0002
Turbilhonamento (1-5)	2,03±0,20 ^a	2,67±0,17 ^b	0,0185
Defeitos maiores (%)	13,80±1,41 ^a	6,79±1,61 ^b	0,0016
Defeitos totais (%)	29,71±71	16,32±3,16	0,0020

Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças (P <0,05). Números são médias dos quadrados mínimos ± erro padrão da média.

Concentração de AMH

A concentração de AMH média foi de $2,275 \pm 0,22$ ng/ml, porém, não houve diferença entre as raças ($P > 0,05$). A classe de AMH influenciou os parâmetros seminais sendo que, a qualidade seminal foi melhor nos animais com menor concentração de AMH no período da pré-puberdade (Tab.3).

Tabela 3. Efeito da classe de AMH sobre a qualidade seminal em touros das raças Brahman e Simental puberais.

PARÂMETROS	AMH BAIXO (n=24)	AMH ALTO (n=29)	P
Vigor (1-5)	$3,92 \pm 0,20^a$	$3,33 \pm 0,19^b$	0,0351
Turbilhamento (%)	$2,63 \pm 0,19^a$	$2,06 \pm 0,19^b$	0,0344
Motilidade progressiva (%)	$77,55 \pm 3,80^a$	$65,14 \pm 3,79^b$	0,0230

AMH: Hormônio anti-mulleriano. Na mesma linha, as letras sobrescritas indicam diferenças ($P < 0,05$). Números são médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

Discussão

Houve uma diferença grande entre a idade a puberdade nas raças avaliadas, corroborando achados anteriores (Costa e Silva, 2013.) e atestando efeitos genéticos (Brito et al., 2004) uma vez que os animais nessa propriedade são manejados nutricionalmente de forma semelhante. Segundo Costa e Silva (2013), animais zebuínos demonstram puberdade com idade em torno de 25 a 28 meses enquanto animais taurinos têm essa idade em média de 12 a 14 meses. Taurinos em condições de clima tropical são mais tardios em relação às raças taurinas criadas nas condições de clima temperado (8 a 10 meses de idade) (Costa e Silva, 2013). Além disso, observa-se que os animais taurinos de aptidão para leite são mais precoces do que os animais de aptidão para corte (Lunstra et al., 1978; Guimarães et al., 2011; Costa e Silva, 2013). Neto et al. (2011) observaram idade a puberdade em touros Simental criados em regime extensivo em clima tropical de $13,42 \pm 3,02$. Considerando que a raça Simental utilizada no presente estudo possui aptidão para leite e permaneceu em condições de clima tropical, é aceitável que a idade a puberdade tenha sido um pouco mais tardia (18 meses) do que o esperado.

A CE na raça Simental avaliados na maturidade sexual foi superior à raça Brahman. Segundo Pinto et al. (1989), a CE na raça Nelore variou de 25 cm entre animais com idade entre

16 e 19 meses e 27 a 28,5 cm em animais com idade entre 20 e 22 meses. Dados semelhantes foram observados no presente estudo onde a CE nos animais Brahman com média de 22 meses foi de 28,90. Oliveira et al. (2002), trabalhando com animais das raças Limousin e Kroetz et al. (2006), com animais das raças Charolês e Caracu, obtiveram uma média de CE de 33,5; 34,4 e 32,2 (respectivamente) quando avaliados aos 16 meses de idade. No presente estudo, a CE na raça Simental com idade média de 18 meses foi de 36,57. Esses dados são semelhantes aos observados por Neto et al. (2011) onde a CE foi de 34,88 com idade de 21,43 meses. É comprovado que o tamanho dos testículos está intimamente associado ao desenvolvimento sexual podendo ser utilizado como preditor de precocidade sexual (Neves, 2007). Existe correlação entre as mensurações testiculares realizadas mais precocemente e após a incidência da puberdade (Freneau, 1991). Almquist et al. (1976) e Coulter e Keller (1982) observaram altas correlações que variam entre 0,76 a 0,80, para CE e idade aos 12 e 24 meses. Desta forma, pode-se concluir que a CE mensurada na pré-puberdade pode ser utilizada como preditor da precocidade sexual independente do grupo genético.

A CE foi indicativa de melhor qualidade seminal obtendo-se alta repetibilidade da medida em ambas as raças. O número de células de Sertoli determinam o tamanho dos testículos e a produção diária de espermatozoides (Johnson et al., 2008; Freneau, 1991). Proporção de espermatozoides morfolologicamente normais, melhor performance reprodutiva, maior precocidade sexual e maior volume de esperma são parâmetros associados a CE (Kastelic, 2014). As correlações entre CE e motilidade espermática variam de 0,13 a 1,00, enquanto os resultados entre CE e vigor espermático variam de 0,69 a 0,99 (Bergmann et al., 1997; Quirino et al., 1999; Sarreiro et al., 2002; Silveira, 2004; Dias et al., 2006, 2008). Tendo em vista os aspectos positivos da seleção para CE e sabendo que a herdabilidade dessa característica é de moderada a alta (Corbet et al., 2013), pode-se reforçar a importância da continuidade dessa avaliação como parte do exame andrológico além da inclusão dessa mensuração no período que antecede a puberdade.

A concentração de AMH mensurada no período da pré-puberdade foi semelhante nos animais zebuínos e taurinos. Rajak et al. (2017) realizaram cinco coletas sanguíneas para determinar variações nas concentrações de AMH em machos zebu e cruzados entre um a 24 meses de idade. Não foi verificada diferença entre as raças com exceção da coleta realizada aos 24 meses onde os machos zebuínos obtiveram maiores concentrações de AMH em relação aos

cruzados. Provavelmente, essa diferença se deve à puberdade mais tardia observada em machos zebu comparados aos cruzados. No presente estudo, como a dosagem foi realizada no período que antecedeu a puberdade, não observamos diferença nas concentrações de AMH em relação ao grupo genético.

A concentração de AMH foi um bom indicativo de precocidade sexual. Os animais classificados com baixas concentrações de AMH obtiveram melhores resultados no exame andrológico realizado no momento da incidência da puberdade. A expressão de AMH é superior em machos em relação às fêmeas sendo que, sua concentração é superior no período que antecede a puberdade e vai decrescendo a medida que ocorre a maturação testicular (El-Shake Ali et al., 2017; Kitahara et al., 2016; Rota et al., 2002). Segundo Ford & Wise. (2009), células de Sertoli imaturas secretam grande quantidade de AMH. Em bovinos, as células de Sertoli imaturas se proliferam de quatro até 13 a 20 semanas de idade (Rawlings et al., 2008). Kitahara et al. (2016), observaram em machos Japanese Black que, a concentração de AMH aumenta do nascimento até dois meses de idade e inicia um decréscimo após o quinto mês. Segundo Rajak et al. (2017), a abundância transcripcional do gene do AMH foi maior com um mês de idade e após, diminuiu significativamente com o avanço da idade quando foi basal aos 24 meses em machos cruzados. A expressão reduzida de AMH pelas células de Sertoli está diretamente relacionada com o aparecimento da espermatogênese nos túbulos seminíferos (Almeida et al., 2012). Baixas concentrações de AMH ocasionam alterações morfológicas e funcionais do trato reprodutor dando suporte à atividade espermatogênica no período da pré-puberdade. Desta forma, concentração de AMH e o início da espermatogênese são eventos opostos. Em estudo realizado por Almeida et al. (2012) com equinos, houve redução na expressão do RNAm para AMH e seu receptor a medida que há aumento da expressão de RNAm para os receptores de andrógenos nas células de Sertoli.

No presente estudo, uma única amostra coletada no período da pré-puberdade foi um bom indicativo da qualidade seminal em touros Simental e Brahman. Em equinos, foi evidenciado o padrão de concentração inferior de AMH em potros que possuíam puberdade precoce (Ball et al., 2008; Claes et al., 2013). Em estudo realizado por Queiroz (2014), 37 tourinhos foram submetidos à 3 coletas de sangue em intervalos de 3 meses para determinar se as alterações na concentração de AMH iriam prever puberdade. Concluíram que o AMH pode ser um marcador endócrino efetivo na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios com

uma única coleta sanguínea. No entanto, Costa Filho et al. (2017) não observaram associação entre a concentração de AMH mensurada em machos Nelore no período da desmama, aos 12 e 16 meses com a incidência de puberdade superprecoce, precoce ou tardio. A ausência de relação naquele estudo com a raça Nelore pode estar associada ao período em que os animais foram submetidos à avaliação andrológica. Neste estudo, a concentração de AMH foi quantificada à desmama, aos 12 e 16 meses onde também foram submetidos à coleta de sêmen. Considerando que os animais utilizados são zebuínos, espera-se que a idade à incidência da puberdade seja um pouco mais tardia (22 meses aproximadamente) podendo então ter refletido na ausência de relação com a concentração de AMH. No presente estudo, uma única dosagem de AMH no período que antecedeu a puberdade mostrou eficaz na predição do início da puberdade tanto em touros Brahman quanto em Simental. Desta forma, a utilização desse marcador deve ser avaliada com o intuito de predizer precocemente a incidência de puberdade.

Conclusões

A concentração de AMH foi correlacionada com a circunferência escrotal e com os parâmetros de qualidade seminal turbilhão, motilidade e vigor. A circunferência escrotal foi correlacionada com a concentração de AMH e com os parâmetros seminais sendo a sua mensuração indispensável na avaliação dos machos mesmo antes da incidência da puberdade. O AMH foi um marcador endócrino de precocidade sexual em machos jovens das Brahman e Simental e a sua avaliação deve ser considerada nos programas de seleção para precocidade sexual e potencial reprodutivo.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada e financiada pela Casa Branca Agropastoril Ltda, Silvianópolis-MG em parceria com Instituto GENESE de coleções científicas, São Paulo, BR. Não houve conflito de interesses que pudesse ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Referências

- Almquist, J.O., Amann, R.P., 1976. Puberal characteristics and post puberal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently. *J. Dairy Sci.* 59 (5), 986-991.
- Almeida, J., Conley, A.J., Mathewson, L., Ball, B.A., 2012. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. *Theriogenology.* 77, 847-857.
- Ball, B.A., Conley, A.J., Grundy, S.A., Sabeur, K., Liu, I.K., 2008. Expression of anti-Müllerian hormone (HAM) in the equine testis. *Theriogenology.* 69, 624–631.
- Bergmann, J.A.G., Quirino, C.R., Vale Filho, V.R., Andrade, V.J., Fonseca, C.G., 1997. Herdabilidades e correlações genéticas entre medições testiculares e características espermáticas em touros Nelore. *Arch. Latin. Produc. Anim.* 5, 473-475.
- Blom, E., 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. *Nord. Vet. Med.* 25, 383-39.
- Brito, L.F.C., Silva, A.E.D., Barbosa, R.T., Kastelic, J.P. 2004. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology.* 61, 511-528.
- Claes, A., Ball, B.A., Almeida, J., Corbin, C.J., Conley, A.J., 2013. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology.* 79, 1229-1235.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- Corbet, N.J., Burns, B.M., Johnston, D.J., Wolcott, M.L., Corbet, D.H., Venus, B.K., Li, Y., McGowan, M.R., Holroyd, R.G., 2013. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. *Anim. Prod. Sci.* 53 (2), 101-113.
- Costa e Silva, E.V., Ferreira, B.X., Queiroz, V.L.D., Costa Filho, L.C.C., Zúccari, C.E.S.N., 2013. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 37, 97-104.

- Costa Filho, A.L.C.C., Soligo, E.C., Peixoto, A.S., Barbosa, F.B., Rossignolo, E.A.A., Assis, T.S., Oliveira, V.M., Souza, M.I.L., Costa e Silva, E.V., 2017. Avaliação do hormônio Anti-Mülleriano à desmama e precocidade sexual de machos Nelore. In: Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA). 2, 2017, Corumbá. Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), Corumbá, 2017, 67-70.
- Coulter, G.H., Keller, D.G., 1982. Scrotal circumference of young beef bulls: Relations hip to paired teste weight, effect of breed and predictability. *J. Anim. Sci.* 62 (91), 133-139.
- Dias, J.C., Andrade, V.J., Fridrich, A.B., Salvador, D.F., Vale Filho, V.R., Corrêa, A.B., Silva, M.A., 2006. Estimativas de parâmetros genéticos de características reprodutivas de touros Nelores, de dois e três anos de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 58, 388-393.
- Dias, J.C., Andrade, V.J., Martins, J.A.M., Emerick, L.L., Vale Filho, V.R., 2008. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesq. Agro. Bras.* 43, 53-59.
- El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Takahashi, T., Mido, S., Sadawy, M., Kobayashi, I., Hemmi, K., Osawa, T., 2017. Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset. *Biol. Reprod.* 97, 153-161.
- Ford, J.J., Wise, T.H. Sertoli cell differentiation in pubertal boars., 2009. *J. Anim. Sci.* 87, 2536-2543.
- Freneau, G.E. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir desde os deis até os 21 meses de idade (puberdade e pós-puberdade). Belo Horizonte, MG. 1991. 194p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1991.
- Freneau, G.E., Vale Filho, V.R., Marques JR, A.P., Maria, W.S., 2006. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (6), 1107-1115.
- Guimarães, J.D., Guimarães, S.E.F., Siqueira, J.B., Pinho, R.O., Eler, J.P., Ferraz, J.B.S., Silva, MR., Borges, J.C., 2011. Seleção e manejo de touros zebu. *Rev. Bras. Zoot.* 40, 379-388.
- Hancoch, J.L., 1957. The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microsc. Sco.* 76, 84- 97.
- Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably

- predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225.
- Johnson, L., Thompson, Jr. D. L., Varner, D.D., 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis., 2008. *Anim. Reproduc. Sci.* 105, 23-51.
- Kastelic, J.P., 2014. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology.* 81 (1), 18-23.
- Kitahara, G., Kamata, R., Sasaki, Y., El-Sheikh Ali, H., Mido, S., Kobayashi, I., Hemmi, K., Osawa, T., 2016. Changes in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. *Domest. Anim. Endocrinol.* 57, 127-132.
- Kroetz, I.A., Tahira, J.K., Perotto, D. et al. 2006. Circunferência escrotal e características de sêmen de touros Charolês, Caracu e cruzamentos recíprocos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 24, 101-106.
- Lunstra, D.D., Ford, J.J., Echternkamp, S.E., 1978. Puberty in beef bulls: hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J. Anim. Sci.* 46, 1054-1062.
- Neto, T.M., Castilho, E.F., Pinho, R.O., Guimarães, S.E.F., Costa, E.P., Guimarães, J.D., 2011. Puberdade e maturidade sexual em touros jovens da raça Simental, criados sob regime extensivo em clima tropical. *Rev. Bras. Zootec.* 40 (9), 1917-1924.
- Neves, A.L.A. Biometria e morfologia testicular em bovinos da raça nelore criados a pasto. 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-BA, 2007.
- Okay, T.S., 2003. Hormônio anti-mulleriano: importância na prática pediátrica. *Ver. Assoc. Med. Bras.* 49, 1-23.
- Oliveira, J., Neves, J., Moraes, J., Gonçalves, P., Bahr, J., Hernandez, A., Costa, L., 2002. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 1-10.
- Pinto, P.A., Silva, P.R., Albuquerque, L.G., Bezerra, L.A.F., 1989. Avaliação da biometria testicular e capacidade de monta em bovinos das raças Guzerá e Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 13 (3), 151-156.

- Queiroz, V.L.D. Hormônio anti-mulleriano sérico como preditor da puberdade de touros jovens. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, FAMEZ, Campo Grande, MS, 2014.
- Quirino, C.R., Bergmann, J.A.G., Vale Filho, V.R., 1999. Estudo da variabilidade genética de características reprodutivas em touros da raça Nelore. *Arch. Latin. Prod. Anim.* 7, 63-74.
- Rajak, S.K., Kumaresan, A., Attupuram, N.M, Chhillar, S., Baithalu, R.K., Nayak, S., Sreela, L., Singh, R.K., Tripathi, U.K., Mohanty, T., 2018. Age-related changes in transcriptional abundance and circulating levels of anti-Mullerian hormone and Sertoli cell count in crossbred and Zebu bovine males. *Theriogenology.* 89, 1-8.
- Rawlings, N., Evans. A.C.O., Chandolia, R.K., Bagu, E.T., 2008. Sexual maturation in the bull. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 295-301.
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B., Rey, R., 2002. Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 129-139.
- Sarreiro, L.C., Bergmann, J.A.G., Quirino, C.R., Pineda, N.R., Ferreira, V.C.P., Silva, M.A., 2002. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 54, 602-608.
- Silveira, T.S. Estádio de maturidade sexual e estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de características reprodutivas e ponderais, em touros da raça Nelore. 2004. 137f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.