



TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO

**RELAÇÕES ENTRE POPULAÇÃO
FOLICULAR ANTRAL, HORMÔNIO ANTI-
MÜLLERIANO, MASTITE E FERTILIDADE
EM BOVINOS**

**LAVRAS – MG
2018**

TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO

**RELAÇÕES ENTRE POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL,
HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO, MASTITE E FERTILIDADE
EM BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

Co-orientadores

Dr. José Nélio de Sousa Sales

Dra. Nadja Gomes Alves

**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).**

Pinto, Tássia Louregiani Carvalho.

Relações entre população folicular antral, hormônio anti-Mülleriano, mastite e fertilidade em bovinos / Tássia Louregiani Carvalho Pinto. - 2018.

68 p.

Orientador (a): José Camisão de Souza.

Coorientador (a): José Nélio de Sousa Sales, Nadja Gomes Alves.

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

Bibliografia.

1. Vacas de leite. 2. Contagem de células somáticas. 3. Contagem folicular antral. I. Souza, José Camisão de. II. Sales, José Nélio de Sousa. III. Alves, Nadja Gomes. IV. Título.

TÁSSIA LOUREGIANI CARVALHO PINTO

**RELAÇÕES ENTRE POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL,
HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO, MASTITE E FERTILIDADE
EM BOVINOS**

**RELATIONSHIPS AMONG ANTRAL FOLLICLE POPULATION,
ANTI-MÜLLERIAN HORMONE, MASTITIS AND FERTILITY IN
CATTLE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de Janeiro de 2018.

Dr. Paulo César de Aguiar Paiva
Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira
Dr. Gustavo Augusto de Andrade
IFSULDEMINAS/MACHADO
Dra. Lourenya Tatiana Flora Chalfun

UFLA
EPAMIG

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

Aos meus pais, Aparecida e Henrique, que sempre estão ao meu lado me apoiando, dando força, amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por tudo que sempre fez por mim, pela força e perseverança que sempre dá.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado com todo amor incondicional e apoio. A eles que devo tudo que sou e que muito me ensinaram e continuam me ensinando. Agradeço por estarem ao meu lado nos momentos felizes, compartilhando alegrias comigo, e nos momentos difíceis me ajudando a superá-los.

Aos meus irmãos pelo afeto e amizade.

À minha vó Ivone pelo carinho e pelas orações.

Ao Zezé pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, dedicação e orientação. Pelo grande profissional e mentor que é.

À toda minha família e amigos pelo suporte e afeto.

À Professora Dra Charlotte Farin por me receber na Universidade Estadual da Carolina do Norte, e por todos ensinamentos, suporte e amizade.

Ao Dr Marcos Brandão pela ajuda na EPAMIG e pela amizade.

A todas as pessoas que me ajudaram na execução do trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos a mim concedida e ao programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Só sei que nada sei.

(Sócrates)

RESUMO

Na seleção de vacas leiteiras, a fertilidade é um dos aspectos mais relevantes para a manutenção de índices produtivos apropriados. A resistência a infecções e qualidade do leite são igualmente importantes devendo ser selecionadas conjuntamente com fertilidade. O objetivo foi avaliar as relações entre contagem folicular antral (CFA), concentrações de hormônio anti-Mülleriano (AMH), mastite e fertilidade em raças leiteiras taurinas e zebuínas. No experimento 1, realizado em Raleigh, NC-EUA, foram utilizadas 79 vacas das raças Jersey (n = 22) e Holandês (n = 57) em lactação. O experimento 2 foi realizado com 80 vacas Girolando e o terceiro com 39 vacas Gir da EPAMIG. Vacas em lactação, com pelo menos 20 dias pós-parto e no máximo 28 dias de gestação, foram submetidas à ultrassonografia transvaginal para CFA, medida da largura vulvar e amostragens de sangue para AMH. Os dados reprodutivos, e de contagem de células somáticas (CCS) foram obtidos do DHIA no experimento 1 e nos demais da EPAMIG. Os dados foram analisados por procedimentos do SAS[®], sendo normalizados quando necessário. Foram criadas classes de largura vulvar, CFA e de AMH para avaliar, via procedimentos GLIMMIX, seus efeitos sobre fertilidade e CCS. Foram realizadas análises de regressão simples (PROCREG), análise de regressão generalizada para testar efeitos de classes de AMH, CFA, paridade e idade sobre variáveis reprodutivas, produtivas e de CCS. No experimento 1, as concentrações de AMH e CFA foram positivamente correlacionadas nas raças Holandês (r = 0,66; P < 0,0001) e Jersey (r = 0,68; P = 0,0005), respectivamente. Considerando-se ambas as raças, houve correlações positivas entre CFA e largura vulvar (r = 0,26; P = 0,02) e entre CFA e AMH (r = 0,62; P < 0,0001). O intervalo de parto (IDP) foi menor (P < 0,0001) na classe de AMH alto (352,68 ± 4,13 dias) comparada com a de AMH baixo (379,69 ± 5,38 dias), e também foi menor (P < 0,05) na classe largura vulvar maior (372,47 ± 4,85 dias) comparada com a menor (359,52 ± 4,57 dias). A CCS e o número de

serviços por concepção não foram influenciados pelas classes estudadas. No experimento 2, o IDP não foi influenciado pela classe de AMH, mas foi menor ($P < 0,05$) na classe de largura vulvar menor ($418,96 \pm 3,17$ dias) comparada à maior ($444,10 \pm 4,58$ dias). A CCS (células/mL de leite) foi maior ($P < 0,05$) para a classe de AMH baixo ($187.813,00 \pm 94,16$ vs $409.951,00 \pm 117,57$) e de largura vulvar menor ($352.726,00 \pm 111,05$ vs $218.284,00 \pm 98,59$). Houve correlação positiva ($r = 0,53$; $P < 0,0001$) entre CFA e largura vulvar. No experimento 3 houve correlação ($r = 0,51$; $P < 0,04$) entre AMH e CFA na raça Gir. Em conclusão, foram encontradas relações entre as classes de AMH, CFA e de largura vulvar com características reprodutivas e saúde da glândula mamária, o que permite considerar seu uso na seleção de vacas de leite, após mais estudos com números maiores de animais.

Palavras chave: Vacas de leite. Contagem de células somáticas. Contagem folicular antral. Genitália externa.

ABSTRACT

In the selection of dairy cows, fertility is one of the most relevant aspects. Resistance to infections and milk quality must be included with fertility in selection programs. The objective was to evaluate the relations among antral follicle count (AFC), anti-Müllerian hormone (AMH), mastitis and fertility in taurine and zebu cows. In trial 1, carried out in Raleigh, NC-EUA, Jersey (n = 22) and Holstein (n = 57) lactating cows were used. In experiments 2 and 3, 80 Girolando, and 39 Gir cows from EPAMIG were used. All cows, with at least 20 days post-partum and a maximum of 28 days into gestation, were ultrasounded to assess AFC, measured for vulvar width and blood sampled for AMH. Reproductive and somatic cell count (SCC) were obtained from DHIA and EPAMIG. Data were analyzed using SAS® (Cary, NC- EUA) which were normalized when necessary. The effects of vulvar width, AFC and AMH classes on fertility and mastitis-related (SCC) data were evaluated through the GLIMMIX procedure with the proper pre-defined distributions and transformations required. Simple (PROCREG) and multivariate (JMP-SAS®, Cary, NC-EUA) procedures were used to investigate relations among the variables. A generalized regression model (JMP-SAS®, Cary, NC-EUA) was used to test the effects of AMH, AFC, parity and age classes on reproductive and mastitis-related variables. In experiment 1, AMH concentrations and AFC were positively correlated in the Holstein ($r = 0.66$; $P < 0.0001$) and Jersey ($r = 0.68$; $P = 0.0005$) breeds, respectively. Considering both breeds (n = 79) there were positive correlations between AFC and vulvar width ($r = 0.26$; $P = 0.02$) and between AFC and AMH ($r = 0.62$; $P < 0.0001$). Post-partum interval (PPI) was shorter ($P < 0.0001$) in the high AMH class (352.68 ± 4.13 days) compared to the low AMH class (379.69 ± 5.38 days), and it was also longer ($P < 0.05$) in the large (372.47 ± 4.85 days) compared to the small (359.52 ± 4.57 days) vulvar width class. The classes studied in experiment 1 did not influence SCC and the number of services per conception. In experiment 2, the calving

interval was not influenced by AMH class, but was shorter ($P < 0.05$) in the small (418.96 ± 3.17 days) compared to the large (444.10 ± 4.58 days) vulva class. Milk somatic cell count (cells/mL) was higher ($P < 0.05$) in the low AMH class ($187,813.00 \pm 94.16$ vs $409,951.00 \pm 117.57$) and in the small vulva class ($352,726.00 \pm 111.05$ vs $218,284.00 \pm 98.59$). There was a positive correlation ($r = 0.53$; $P < 0.0001$) between CFA and vulva width. In experiment 3 AMH and CFA were positively correlated ($r = 0.51$; $P < 0.04$). In conclusion, some relationships among AMH, AFC and vulva width were indicative of fertility and udder health, which sets grounds for possible consideration in selection for dairy cows fertility, as long as, studies with larger numbers of cows are done.

Key words: Dairy cows. Somatic cell counts. Antral follicle count. External genitalia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-pg/mL) e contagem folicular antral (CFA) para a raça Holandês (n=57)	47
Figura 2 Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-pg/mL) e contagem folicular antral (CFA) para a raça Jersey (n=22)	48
Figura 3 Relação entre contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar (cm) para a raça Girolando (n=80).....	55
Figura 4 Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-ng/mL) e contagem folicular antral (CFA) para raça Gir (n=39)	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Efeito de hormônio anti-Mülleriano (AMH), raça, contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar sobre parâmetros de saúde da glândula mamária e reprodução nas raças Holandês e Jersey..... 67
- Tabela 2 Efeito das classes de CFA e largura vulvar sobre parâmetros de saúde da glândula mamária e reprodução em vacas Girolando 68
- Tabela 3 Efeito do hormônio anti-Mülleriano (AMH), idade, contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar sobre intervalo de parto (meses) e idade ao primeiro parto (anos) na raça Gir 69

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Genitália externa	17
2.2 Contagem folicular antral	18
2.3 Hormônio anti-Mülleriano	19
2.4 Atuação do AMH em técnicas de reprodução assistida como marcador de reserva	22
2.5 Saúde da glândula mamária e reprodução	24
REFERÊNCIAS.....	27

SEGUNDA PARTE – ARTIGO: Relações entre população folicular

antral, hormônio anti-Mülleriano, mastite e fertilidade em bovinos.....	31
Resumo	32
Introdução	33
Material e Métodos	36
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão	59
Referências	59

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é essencial para os sistemas de produção de leite. Ao longo dos anos, vacas de leite têm sido alvo de melhoramento genético para produção, porém, muitas vezes, essa busca pela alta produtividade traz consigo efeitos negativos na reprodução.

A seleção genética de gado de leite não foi direcionada para fenótipos diretamente ligados à reprodução. Como características de funcionalidade ovariana estão ligadas à eficiência reprodutiva, a seleção exacerbou a produção de leite em detrimento da reprodução. Nesse sentido, a população folicular antral é um fenótipo de fácil acesso estando caracterizado desde as fases iniciais de desenvolvimento das fêmeas de reposição. Isso facilita a seleção precoce de fêmeas com indicativo de fertilidade mais alta. É importante ressaltar que o ideal seria que essas fêmeas também fossem de alta produtividade. Desta forma, o estabelecimento de relações positivas entre a produtividade e fertilidade é um passo adicional importante para um direcionamento mais equilibrado do melhoramento genético, com reflexos benéficos na lucratividade da exploração leiteira.

Outra característica importante é a ligação entre a população folicular antral e a concentração de hormônio anti-Mülleriano (AMH). Para fins de seleção genética precoce o AMH é de grande valia, pois pode ser dosado em bezerras. O estabelecimento de possíveis relações do AMH com produtividade também pode adicionar subsídios para o melhoramento genético.

O estudo comparativo de características reprodutivas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* e de suas possíveis ligações com produção é essencial para a seleção

genética, principalmente para animais zebuínos, cujos estudos relacionados são mais escassos.

O objetivo é identificar possíveis relações entre contagem folicular antral, concentrações de AMH, morfometria da genitália externa, mastite e fertilidade em *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Hipotetiza-se que contagens altas de folículos, assim como largura vulvar maior, são positivamente correlacionadas com concentrações altas de AMH, fertilidade e baixa ocorrência de mastite em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Genitália externa

A medida da rima vulvar é o comprimento entre as comissuras dorsal e ventral da fenda vulvar. A distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus é a largura vulvar (MESQUITA et al., 2016).

Com o intuito de verificar um fenótipo fácil de visualizar, os trabalhos a seguir foram realizados medindo-se a largura vulvar e/ou rima vulvar de vacas, tendo a hipótese inicial desses trabalhos de que animais com vulva maior seriam mais férteis.

Em animais da raça Tabapuã a largura da vulva foi correlacionada negativamente com intervalo de parto (IDP) e também animais com contagem folicular antral (CFA) mais alta tiveram IDP mais curto (MACULAN et al., 2018).

Um trabalho foi realizado com tratos genitais de animais de abatedouro, sendo esses predominantemente cruzados Zebu/Holandês. A contagem folicular antral foi menor em animais com largura vulvar grande quando comparada à largura média e pequena. Em relação ao comprimento da rima vulvar não houve diferença na CFA (MESQUITA et al., 2016).

Diferentemente dos trabalhos acima citados, nos quais mediram-se rima e largura, Gobikrushanth et al. (2017) tentaram correlacionar a distância anogenital (DAG) de vacas com algumas características de interesse produtivo. Foi observado que a DAG diferiu entre as classes de paridade (primeira, segunda e terceira crias). Esses autores relataram que a distância anogenital e gestação à primeira inseminação artificial (IA) foram negativamente relacionadas em vacas

de primeira e segunda crias, ou seja, para cada aumento de uma unidade (mm) de DAG, as chances de concepção à primeira IA caíam 3,4 e 2,4% para primeira e segunda crias, respectivamente ($P < 0,05$).

Pode-se notar que poucos trabalhos foram realizados com medidas de rima ou largura vulvares, sendo, portanto, necessário que mais pesquisas sejam feitas com o objetivo de mostrar se essas medidas são eficientes ou não para apontar animais mais férteis.

2.2 Contagem folicular antral

Folículos antrais são os folículos que apresentam antro bem definido, sendo os maiores que um milímetro visíveis à imagem ultrassonográfica transvaginal. A contagem desses folículos representa a contagem folicular antral (CFA).

Existe grande variabilidade no número de folículos entre animais, porém dentro do mesmo animal há grande repetibilidade na contagem folicular (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2008).

Silva-Santos et al. (2014b) compararam animais *Bos indicus* (Nelore) x *Bos indicus-taurus* (1/2 Nelore x Angus) e dividiram cada grupo genético em alta CFA e baixa CFA e observaram após 5 avaliações ultrassonográficas que havia grande repetibilidade na contagem dos folículos antrais. O número de folículos pré-antrais das vacas *Bos indicus-taurus* com CFA alta foi maior ($P < 0,05$) que das vacas *Bos indicus* com CFA alta. Porém, esses autores não encontraram correlação significativa entre as populações de folículos antrais e pré-antrais.

As médias do número de Complexos *Cumulus Oophorus* (CCOs) recuperados e os oócitos viáveis foram maiores ($P < 0,05$) em doadoras cruzadas *Bos indicus-taurus* (3/8 Nelore x 5/8 Hereford) com CFA alta em relação às

fêmeas de CFA baixa, e, conseqüentemente, essas fêmeas de contagem alta tiveram maiores ($P < 0,05$) números de embriões totais produzidos (SILVA-SANTOS et al., 2014a). Similarmente, Santos et al. (2016) relataram que vacas Nelore com alta produção de oócitos (que eram os animais considerados com alta CFA) tiveram maior número de embriões viáveis quando comparadas com as vacas de média e baixa CFA.

Um experimento foi realizado com novilhas Holandês, sendo que esses animais foram divididos em três grupos quanto ao número de folículos ≥ 3 mm de diâmetro: baixo (≤ 15 folículos), médio (16-24) e alto (≥ 25). Vacas que foram classificadas como novilhas do grupo alto tiveram menos ($P < 0,02$) lactações começadas e completadas do que as do grupo baixo. Em adição, vacas do grupo alto tiveram 180 dias a menos ($P < 0,01$) de vida produtiva no rebanho comparadas às vacas do grupo baixo. As vacas do grupo alto tiveram 33% a mais de probabilidade ($P = 0,05$) de serem descartadas após o primeiro parto do que vacas do grupo baixo (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017).

2.3 Hormônio anti-Mülleriano

O hormônio anti-Mülleriano (AMH), também conhecido como substância inibidora Mülleriana ou ainda, antígeno anti-Mülleriano, é uma glicoproteína que causa a regressão dos ductos de Müller no embrião macho. Na fêmea esses ductos dão origem ao sistema genital tubular, formado pelo útero, vagina e tubas uterinas (CATE et al., 1986). Nos machos esse hormônio é produzido pelas células de Sertoli (JOSSO, 1973) e nas fêmeas, pelas células da granulosa (VIGIER et al., 1984).

A expressão do AMH em fêmeas ocorre somente pelas células da granulosa de pequenos folículos em crescimento (pré-antrais e pequenos antrais) não atresícos em ratas e camundongos fêmeas. Sua expressão só começa após os

folículos primordiais serem recrutados para o *pool* crescente (BAARENDS et al., 1995). As células da granulosa de grandes folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais são as que expressam com maior intensidade o AMH. No entanto, da fase antral em diante, há o desaparecimento da expressão de AMH, havendo ausência em folículos pré-ovulatórios e corpo lúteo, assim como há também o desaparecimento em folículos atrésicos (GRUIJTERS et al., 2003; BAARENDS et al., 1995).

McGee & Hsueh (2000) propuseram duas designações para explicar o recrutamento dos folículos ovarianos: a primeira foi chamada de recrutamento inicial, no qual alguns folículos primordiais são estimulados por fatores intra-ovarianos e/ou outros fatores não conhecidos a iniciarem o crescimento, sendo que os demais folículos continuam quiescentes por meses ou anos. Esse recrutamento começa após a formação do folículo já na vida fetal e continua ao longo da vida; a segunda, denominada recrutamento cíclico, começa após o início da puberdade, sendo o aumento do FSH circulante essencial em cada ciclo reprodutivo para não deixar que um grupo de folículos antrais entre em atresia.

A expressão do AMH em ovários de ratas e camundongos fêmeas se dá logo após o recrutamento inicial, continuando durante o crescimento do folículo até o ponto de recrutamento cíclico, sugerindo então um papel relevante do AMH no desenvolvimento folicular (GRUIJTERS et al., 2003). Esses autores ainda mostraram, em um estudo com camundongos fêmeas, que o AMH inibe o recrutamento de folículos primordiais e diminui a sensibilidade ao FSH de grandes folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais. Esse achado corrobora o trabalho de Durlinger et al. (1999), no qual os camundongos fêmeas com ovários nulos de AMH nas fases pré-puberal (25 dias de idade) e idade adulta (4 meses de idade) tinham mais folículos em crescimento do que suas irmãs de ninhada com ovários com expressão de AMH normal. Isso implica que mais folículos primordiais são recrutados no *pool* de crescimento na ausência de

AMH. Porém, foi observado que na idade adulta (4 e 13 meses) existiam menos folículos primordiais nas fêmeas com ausência de AMH do que nas fêmeas com AMH normal. Isso leva a crer que o AMH previne a depleção precoce do *pool* de folículos ovarianos quando há a inibição do recrutamento inicial (GRUIJTERS et al., 2003).

Em relação ao recrutamento cíclico, a inibição provocada pelo AMH serve para controlar a quantidade de folículos grandes pré-antrais e folículos pequenos antrais que vão crescer e podem se tornar folículos pré-ovulatórios (GRUIJTERS et al., 2003).

Em mulheres, já foram encontrados resultados divergentes em relação às concentrações de AMH durante o ciclo ovariano. Hehenkamp et al. (2006) não encontraram diferenças durante o ciclo menstrual normal. Por outro lado, as concentrações de FSH, LH e estradiol variaram significativamente ao longo do ciclo estral, como esperado. No entanto, Sowers et al. (2010) observaram diferenças significativas ao longo do ciclo menstrual.

Em bovinos, sabe-se que não existe variação significativa nas concentrações de AMH ao longo do ciclo estral, possibilitando então trabalhar com somente uma amostra de sangue de cada animal retirada em qualquer fase do ciclo (IRELAND et al., 2008; RICO et al., 2009). Corroborando esses autores, Ribeiro et al. (2014) coletaram duas amostras de sangue de vacas de leite, uma no dia 7 do ciclo estral, outra no dia 15, e observaram que as concentrações de AMH das duas amostras foram correlacionadas positivamente, não havendo diferença em relação ao dia da coleta.

Souza et al. (2015), em vacas de leite de alta produção, constataram que não houve variação nas concentrações de AMH após três coletas de sangue em dias diferentes do ciclo estral.

2.4 Atuação do AMH em técnicas de reprodução assistida como marcador de reserva

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é um marcador endócrino, relativamente novo, que tem sido estudado, principalmente em mulheres, como marcador de resposta ovariana, mas já abrange outras espécies, inclusive bovinos (VAN ROOIJ et al., 2002; HAZOUT et al., 2004; IRELAND et al., 2008; RICO et al., 2009).

É de grande importância ressaltar que, a contagem folicular antral (CFA) é positiva e altamente relacionada à concentração de AMH (IRELAND et al., 2008).

Este hormônio tem sido associado a técnicas de reprodução assistida. Em um estudo com fertilização *in vitro* (FIV), mulheres (n = 48) foram divididas em responsivas pobres (< 4 oócitos), normais (entre 4 e 8 oócitos), boas (entre 9 e 16 oócitos) e altas (> 16 oócitos). As concentrações séricas de AMH foram significativamente mais baixas para as responsivas pobres e mais altas para as altas. O grupo de responsivas pobres teve número de folículos > 16 mm menor do que os outros grupos, enquanto que o grupo de responsivas altas foi maior do que os demais grupos. A quantidade de oócitos também foi baixa para as pobres, assim como foi alta para as altas. A concentração de AMH foi correlacionada positivamente com a recuperação de oócitos. A taxa de gestação foi de 12,5% para as pobres e de 60% para as altas ($P < 0,05$). Com esses resultados, nota-se que o AMH é um bom marcador de reserva ovariana, tendo em vista que as mulheres com maior concentração desse hormônio tiveram mais folículos > 16 mm, mais oócitos recuperados e maior taxa de gestação (La MARCA et al., 2007).

Segundo Rico et al. (2009), as concentrações de AMH no plasma podem servir como marcador de resposta ovariana em vacas submetidas ao tratamento

de superovulação para produção de embriões *in vivo*. Esses autores relataram que as vacas que tinham maiores concentrações desse hormônio tiveram maiores respostas folicular e ovulatória ao tratamento, porém as vacas com baixas concentrações tiveram pouca resposta. O AMH foi correlacionado positivamente com o número de folículos pequenos (3 - 5 mm) e médios (5 - 7 mm) antes do tratamento, e com os grandes folículos (> 7 mm) no momento do estro (quando já havia sido feito o tratamento), assim como o número de folículos grandes no momento do estro foi correlacionado de forma positiva com o número de corpos lúteos (CLs) na fase lútea (sete dias após o estro).

Guerreiro et al. (2014) observaram correlação positiva entre a concentração plasmática de AMH e o número de folículos, os complexos cumulus oócitos (CCOs) totais recuperados, os CCOs viáveis e a produção *in vitro* (PIV) de embriões em vacas Holandês (*B. taurus*) e Nelore (*B. indicus*) doadoras. Como mostrado em humanos, o AMH em bovinos também é sugerido como marcador endócrino e possivelmente bom preditor para produção *in vitro* de embriões.

Muitos estudos têm sido realizados nas últimas décadas na tentativa de prever a eficiência reprodutiva. Sabe-se que muitos autores já fizeram estudos com vários hormônios, como, progesterona, FSH, LH, tentando associá-los de uma forma precisa à fertilidade, porém alguns autores têm encontrado resultados promissores com o hormônio anti-Mülleriano. Nesse contexto, Ribeiro et al. (2014) encontraram associação positiva entre AMH e fertilidade em vacas de leite. Vacas com menores taxas de gestação e maiores perdas gestacionais entre 30 e 65 dias de gestação tinham menor concentração de AMH no plasma sanguíneo. Ao fim da estação de monta, as vacas que falharam em se tornarem gestantes tinham menor concentração de AMH em relação às vacas que ficaram prenhes.

Medidas da concentração de AMH e ultrassonografias em série com o objetivo de determinar o pico da contagem folicular são importantes, pois representam um método simples para prever com segurança o número relativo de óocitos saudáveis e foliculos nos ovários de vacas jovens adultas de idades semelhantes (IRELAND et al., 2008).

Outro ponto importante do AMH é a possibilidade de prever a vida produtiva no rebanho. Com o objetivo de indicar se uma medida única de AMH em novilhas leiteiras é preditivo para o desempenho de vida útil subsequente, sobrevivência e longevidade no rebanho, o sangue de novilhas Holandês de 11 a 15 meses foi retirado, e os animais que não foram descartados do rebanho tiveram duas lactações e iniciaram a terceira lactação após o parto. Os dados de desempenho e saúde dos animais foram registrados durante o tempo do estudo. Foi observado que o quartil de novilhas com a concentração mais baixa de AMH, teve, em média, vida produtiva mais curta no rebanho, reduzida taxa de sobrevivência após o nascimento no primeiro parto, menor produção de leite na primeira lactação, menor percentagem total de vacas prenhes (ao longo de todas as lactações), maior taxa de descarte por reprodução ruim (primeira lactação) comparado com os animais de mesma idade no rebanho com maior concentração de AMH. Sendo assim, pode-se dizer que o AMH pode ser útil como marcador para melhorar a longevidade de vacas leiteiras no rebanho e para prever a eficiência reprodutiva dessas fêmeas (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2015).

2.5 Saúde da glândula mamária e reprodução

As células somáticas são células de defesa que têm origem no sangue e são comumente encontradas no leite de vacas leiteiras. A contagem dessas células chama-se contagem de células somáticas (CCS) e é realizada periodicamente nos rebanhos. A infecção da glândula mamária está relacionada

com CCS alta (> 200.000 células/mL). O artifício de fazer essa contagem é um bom marcador para sinalizar mastite nos animais (CARAVIELLO et al., 2005).

Já foi mostrado em vários estudos que a mastite pode afetar a reprodução e a fertilidade dos animais. Vacas com mastite tiveram duas vezes mais chance de ter o intervalo de estro alterado (ciclo $<$ que 18 dias ou $>$ que 24 dias) em comparação às suas companheiras de rebanho que não apresentavam mastite (MOORE et al., 1991).

A mastite clínica no início da lactação pode provocar impactos negativos na reprodução de vacas leiteiras. Vacas em início de lactação diagnosticadas com mastite antes da primeira IA podem ter número maior ($P < 0,01$) de dias para ter a primeira inseminação do que vacas diagnosticadas entre a primeira IA e a gestação, vacas diagnosticadas após a gestação ou vacas sem mastite. O número de inseminações também pode ser afetado pela mastite clínica, sendo que as fêmeas com mastite após a primeira IA tiveram maior número de inseminações por concepção do que os outros grupos (BARKER et al., 1998).

Corroborando o estudo anterior, a mastite diminui a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras, tanto sendo diagnosticada antes da primeira IA pós-parto, quanto depois da primeira IA. Taxa de concepção diminuída, mais dias em aberto e maior incidência de abortos foram observações referentes à reprodução nesse estudo como consequência da mastite (SANTOS et al., 2004).

Há ainda poucos estudos sobre a relação da mastite com o hormônio anti-Mülleriano. Porém, Ireland et al. (2010) realizaram um estudo em novilhas de 12 meses no qual uma única amostra de sangue foi retirada de cada animal. Adicionalmente, o tamanho dos ovários e a CFA foram feitas por meio de ultrassonografia. O tamanho ovariano e a contagem folicular foram altamente correlacionados com o AMH ($P < 0,001$). Foi observado que filhas de vacas que apresentaram de 4 a 5 medidas de contagem de células somáticas acima de 200.000 tiveram destacadamente menores concentrações de AMH ($P < 0,02$) do

que as filhas de vacas que tiveram de 0 a 3 medidas. Também, as vacas de 4 a 5 medidas tenderam a ter menor produção de leite ($P < 0,09$) do que as vacas de 0 a 3 medidas e eram 2 anos mais velhas ($P < 0,01$; 6,1 vs 4,4 anos). Esses autores mostraram que, apesar de não ser algo bem esclarecido ainda, vacas mais velhas com infecção mamária crônica têm, não somente menor produção de leite, como também têm suas filhas com reserva folicular diminuída e AMH mais baixo, podendo essas filhas terem desempenho reprodutivo prejudicado.

Portanto, face a esses resultados indicativos de possível relação do hormônio anti-Mülleriano com a mastite em vacas, mais estudos são necessários e justificáveis.

REFERÊNCIAS

- BAARENDS, W. M. et al. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. **Endocrinology**, v. 136, p. 5614-5622, 1995.
- BARKER, A. R. et al. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1285-1290, 1998.
- 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**, v. 73, p. 54-62, 2005.
- CARAVIELLO, D. Z. et al. Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 804-811, 2005.
- 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, jun. 1986.
- DURLINGER, A. L. L. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5789-5796, 1999.
- GOBIKRUSHANTH, M. et al. Characterization of anogenital distance and its relationship to fertility in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9815-9823, 2017.
- GRUIJTERS, M. J. G. et al. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 211, p. 85-90, 2003.
- GUERREIRO, B. M. et al. Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 49, p. 96-104, 2014.
- HAZOUT, A. et al. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol.

Fertility and Sterility, v. 82, n. 5, p. 1323-1329, Nov. 2004.

HEHENKAMP, W. J. K. et al. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4057-4063, 2006.

IRELAND, J. J. et al. 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: Proceedings of The Society for the Study of Reproduction 2010 Annual Meeting**. Abstract 277, p. 62, 2010.

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, p. 1219-1225, 2008.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 5019-5027, 2017.

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, n. 5, p. 3036-3045, 2015.

JOSSO, N. *In vitro* synthesis of Müllerian inhibiting substance hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. **Endocrinology**, v. 93, p. 829-834, 1973.

La MARCA, A. et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. **Human Reproduction**, v. 22, n. 3, p. 766-771, 2007.

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, Feb. 2018.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200-214, Apr. 2000.

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**, v. 62, n. 6, p. 587-590, 2016.

MOORE, D. A. et al. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 36, n. 2, p. 257-265, Aug. 1991.

RIBEIRO, E. S. et al. Plasma anti-müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, 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.

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, J. E. P. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 1-2, p. 31-45, 2004.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Antral follicle populations and embryo production – *in vitro* and *in vivo* – of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 228-232, 2014a.

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, 2014b.

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, n. 1, p. 169-178, 2015.

SOWERS, M. F. et al. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 4, p. 1482-1486, Sep. 2010.

VAN ROOIJ, I. A. et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction**, v. 17, n. 12, p. 3065-3071, Dec. 2002.

VIGIER, B. et al. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 114, p. 1315-1320, 1984.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**Relações entre população folicular antral, hormônio anti-Mülleriano,
mastite e fertilidade em bovinos**

Artigo formatado segundo as normas da Revista *Animal Reproduction*

Science

Relações entre contagem folicular antral (CFA), hormônio anti-Mülleriano (AMH), mastite e fertilidade em bovinos

RESUMO

O objetivo foi avaliar relações entre CFA, AMH, mastite e fertilidade em raças leiteiras. No experimento 1, foram utilizadas 79 vacas Jersey (22) e Holandês (57). Nos experimentos dois e três, foram utilizadas 80 vacas Girolando e 39 Gir, respectivamente. Dados reprodutivos e de mastites foram obtidos do DHIA (Raleigh, NC, EUA) no experimento 1 e nos demais da empresa EPAMIG-MG, Brasil. Dados foram analisados por procedimentos do SAS[®] (Cary, NC, EUA). No experimento 1 houve correlações positivas entre CFA e largura vulvar ($r = 0,26$; $P = 0,02$) e entre CFA e AMH ($r = 0,62$; $P < 0,0001$). O intervalo de parto (IDP) foi menor ($P < 0,0001$) na classe de AMH alto ($352,68 \pm 4,13$ d) comparado com a de AMH baixo ($379,69 \pm 5,38$ d), e também foi menor ($P < 0,05$) na classe de largura vulvar maior ($359,52 \pm 4,57$ d) comparada com a menor ($372,47 \pm 4,85$ d). No experimento 2 o IDP foi menor ($P < 0,05$) na classe de largura vulvar menor ($418,96 \pm 3,17$ d)

comparada à maior ($444,10 \pm 4,58d$). A CCS (células/mL) foi maior ($P < 0,05$) para a classe de AMH baixo ($187,813 \pm 94,16$ vs $409,951 \pm 117,57$) e de largura vulvar menor ($352,726 \pm 111,05$ vs $218,284 \pm 98,59$). Houve correlação positiva ($r = 0,53$; $P < 0,0001$) entre CFA e largura vulvar. No experimento 3 houve correlação ($r = 0,51$; $P < 0,04$) entre AMH e CFA. Em conclusão, foram encontradas relações entre as classes de AMH, CFA e de largura vulvar com características ligadas à reprodução e saúde da glândula mamária.

Palavras chave: Bovinos de leite; Contagem folicular antral; Largura vulvar

1. Introdução

Ao longo dos anos, vacas de leite têm sido alvo de melhoramento genético para produção, trazendo efeitos negativos na reprodução. O intervalo de parto é o parâmetro mais determinante da fertilidade dos rebanhos.

Existe grande variabilidade no número de folículos entre animais, porém, dentro do mesmo animal, há grande repetibilidade (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008).

O AMH é uma glicoproteína que causa a regressão dos ductos de Müller no embrião macho. Na fêmea, esses ductos dão origem ao sistema genital tubular (Cate et al., 1986). Nos machos, esse hormônio é produzido pelas células de Sertoli (Josso, 1973) e nas fêmeas, pelas células da granulosa (Vigier et al., 1984).

A expressão do AMH nas fêmeas ocorre somente pelas células da granulosa de pequenos folículos em crescimento (pré-antrais e pequenos antrais) não atresícos em ratas e camundongos fêmeas. Sua expressão só começa após os folículos primordiais serem recrutados para o *pool* crescente (Baarends et al., 1995). As células da granulosa de grandes folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais são as que expressam com maior intensidade o AMH, no entanto, há ausência da expressão de AMH em folículos pré-ovulatórios e corpo lúteo, assim como não há também expressão em folículos atresícos (Gruijters et al., 2003; Baarends et al., 1995).

Em bovinos não existe variação significativa nas concentrações de AMH ao longo do ciclo estral, possibilitando então, trabalhar com somente uma amostra de sangue de cada animal (Ireland et al., 2008; Rico et al., 2009).

As células somáticas são células de defesa que têm origem no sangue e são encontradas no leite. A contagem de células somáticas (CCS) é realizada periodicamente nos rebanhos. A infecção da glândula mamária está relacionada com CCS alta (>200.000 células/mL), sendo bom marcador para mastite (Caraviello et al., 2005).

Há ainda poucos estudos sobre a relação da mastite com o AMH. Porém, Ireland et al. (2010) realizaram estudo em novilhas de 12 meses em amostra única de sangue. O tamanho dos ovários e a CFA foram altamente correlacionados com o AMH ($P < 0,001$). Filhas de vacas com 4 a 5 medidas de CCS acima de 200.000 tiveram menores concentrações de AMH ($P < 0,02$) do que as filhas de vacas com 0 a 3 medidas.

A medida da rima vulvar é o comprimento entre as comissuras dorsal e ventral da fenda vulvar. A distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima em um ângulo de 90 graus é a largura vulvar (Mesquita et al., 2016).

Com o intuito de verificar um fenótipo fácil de visualizar, trabalhos foram realizados medindo-se a largura vulvar e/ou rima vulvar de vacas, hipotetizando-se que animais com vulva maior seriam mais férteis.

O objetivo é identificar possíveis relações entre contagem folicular antral, concentrações de AMH, morfometria da genitália externa, mastite e fertilidade em *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Hipotetiza-se que contagens altas de folículos, assim como largura vulvar maior, são positivamente correlacionadas com concentrações altas de AMH, fertilidade e baixa ocorrência de mastite em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*.

2. Material e Métodos

2.1. Localização

O experimento 1 foi realizado na Unidade Educacional Leiteira da Universidade Estadual da Carolina do Norte (DEU – NCSU), em Raleigh, Carolina do Norte, Estados Unidos. Os experimentos 2 e 3 foram realizados nas Unidades Experimentais da EPAMIG de Prudente de Moraes-MG e de Uberaba-MG, Brasil, respectivamente.

2.2. Animais

No experimento 1 foram utilizadas vacas primíparas e múltíparas em lactação das raças Holandês (n = 57) e Jersey (n = 22) com escore de

condição corporal entre 2,5 e 4,0 (1,0 magra – 5,0 obesa) com idade média de $3,60 \pm 0,20$ anos (2,0 – 9,0 anos), com produção média de leite de $15.559,33 \pm 773,10$ kg (305 dias). As vacas eram mantidas em *freestall*, alimentadas uma vez ao dia (TMR) e ordenhadas duas vezes ao dia. Eventualmente, as vacas eram soltas em piquetes. A alimentação variava ao longo do ano sendo os principais componentes as silagens de milho e de sorgo, semente e casca de algodão, polpa cítrica, soja, glúten de milho, feno triturado, água, fubá de milho e mistura mineral.

No experimento 2 foram utilizadas vacas cruzadas (n= 80) Girolando criadas em regime semi-intensivo (pastagem de *Brachiaria* com concentrado na hora da ordenha e suplementadas com silagem de milho na época da seca), sendo ordenhadas 2 vezes ao dia. A produção média diária de leite era de $10,11 \pm 0,06$ kg com idade e condição corporal variando de 2 a 8 anos e 3,0 a 4,5 (1,0 magra – 5,0 obesa), respectivamente. A paridade média foi de $4,0 \pm 0,04$ partos.

No experimento 3, vacas Gir leiteiro (n = 39) criadas em regime semi-intensivo com manejo e características produtivas semelhantes ao experimento 2.

2.3. *Procedimentos experimentais*

1) Estádio Reprodutivo

Em todos os experimentos os animais foram incluídos no estudo com no mínimo 20 dias pós-parto e no máximo 28 dias de gestação, assim como, não apresentando sinais de estro e/ou descargas vaginais anormais.

2) Contagem Folicular Antral (CFA)

Em todos os experimentos foram contabilizados os folículos ovarianos, em tempo real, com antro visível ao exame ultrassonográfico, usando a unidade Aloka SSD 500 e transdutor transvaginal convexo de 7,5 MHz, conforme descrito anteriormente (Mesquita et. al., 2016). As sessões de ultrassonografia (US) foram realizadas uma vez para cada animal. A soma da contagem folicular dos dois ovários foi utilizada para a determinação da CFA total para as análises. Após a submissão das contagens à análise de distribuição de frequência (PROCUNIVARIATE), as seguintes classes foram estabelecidas: no experimento 1: CFA baixa- <17 e CFA alta- ≥ 17 folículos antrais; no experimento 2: CFA baixa- <25 e CFA alta- ≥ 25 folículos antrais, e no experimento 3: CFA baixa- <33 e CFA alta- ≥ 33 folículos antrais.

3) Largura Vulvar

A largura vulvar (LV) dos animais foi medida por um paquímetro, segundo Mesquita et al. (2016). Para análises foram estabelecidas as seguintes classes: no experimento 1: LV pequena- <7 cm e LV grande- ≥ 7 cm; no experimento 2: LV pequena- $<6,7$ cm e LV grande- $\geq 6,7$ cm, e no experimento 3: LV pequena- $<9,5$ cm e LV grande- $\geq 9,5$ cm.

4) Determinação do AMH

No experimento 1, o sangue dos animais foi coletado da veia coccígea para determinação do AMH. As amostras foram mantidas refrigeradas e centrifugadas (3000 x g, 10 min) dentro de 6 horas após coleta. O soro foi congelado a -20°C em criotubos até o momento de envio para um laboratório comercial (MOFA, Endocrinology lab. MountHoreb, WI- EUA) para o ensaio de AMH. No experimento 2 o AMH não foi dosado. No experimento 3, as amostras foram obtidas e preparadas para o envio de maneira semelhante ao experimento 1, tendo sido encaminhadas para um laboratório comercial (Kit DSL, Werner, TX

EUA; GENESE, São Paulo, Brasil). As concentrações de AMH foram determinadas por um ensaio de ELISA devidamente validado (Bovine AMH test Kit 21700/1000). Em apenas um ensaio para cada experimento, os coeficientes de variação intra-ensaio situaram-se entre 1,8 a 2,8% nos experimentos 1 e 3. Após submissão das concentrações de AMH à análise de distribuição de frequência (UNIVARIATE), as seguintes classes foram estabelecidas: No experimento1- AMH baixo- <150 pg/mL e AMH alto- \geq 150 pg/mL; Experimento3- AMH baixo- <0,3 ng/mL e AMH alto- \geq 0,3 ng/mL.

5) Contagem de Células Somáticas

No experimento 1, após a remoção dos primeiros jatos, as tetas foram limpas com *swabs* descartáveis impregnados em álcool (Sagroseptwipes; SchulkeandMayr, Sheffield, UK) antes da coleta de uma amostra do fluxo intermediário de leite transferida para tubos estéreis universais de 25 mL para cada teto (BibbySterilin, Staffs, UK). As amostras de leite foram enviadas ao laboratório do DHIA após conservadas a 4°C por menos de 24h. Amostras mensais foram examinadas para CCS usando um contador Coulter (CoulterCounter ZM;

BeckmanCoulter, Buckinghamshire, UK Mofa Global; MountHoreb, Wisconsin, EUA). Para as análises estatísticas dos experimentos 1 e 2 foram estabelecidas as seguintes classes de CCS: Baixa- <200.000 e alta- ≥ 200.000 células somáticas/mL de leite.

A máquina foi calibrada para CCS bovina de acordo com os métodos recomendados pela International Dairy Federation. Em resumo, as amostras de 10 mL foram fixadas em solução de formaldeído a 3,5% e diluídas a 1:400 em solução salina tamponada isotônica (Lechesol; Apertech, Bedfordshire, UK), e uma alíquota de 0,5 mL foi subsequentemente usada para a determinação da CCS. Para corrigir em função da diluição da amostra, o número de CCS/mL foi obtido pela multiplicação por 800 ($[(\text{SCC bruta} \times 400)/500] \times 1000$).

No experimento 2, as amostras de leite para a contagem de células somáticas (CCS) foram armazenadas em frascos plásticos com conservante Bronopol®, devidamente identificados. Em seguida, as amostras foram colocadas em isopor contendo gelo reciclável e enviadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da EMBRAPA Gado de Leite, onde a determinação da CCS foi realizada pelo método de citometria de fluxo. O equipamento utilizado foi Somacount 300 da marca Bentley®.

As contagens de CCS periódicas (mínimo de 4 e máximo de 10 por animal) de 1-5 lactações foram utilizadas para o cálculo do valor médio que foi o valor analisado. A definição de ocorrência de mastite clínica foi de acordo com os valores recomendados pelo DHIA (contagens > 200.000 células somáticas/mL de leite).

6) Idade

No experimento 3 foram estabelecidas duas classes de idade para avaliação de seu efeito sobre o intervalo de partos (IDP) e a idade ao primeiro parto (IPP): Baixa: <8,6 e Alta: ≥8,6 anos.

7) Manejo reprodutivo

As vacas foram submetidas a procedimentos rotineiros de reprodução em cada unidade, tais como inseminação artificial (IA) em tempo fixo ou com estro natural e as seguintes variáveis foram registradas: intervalo de partos, número de serviços por concepção, intervalo do primeiro ao último serviço, taxa de gestação aos 30 e 60 dias pós IA e perdas embrionárias de 30 a 60 dias. No experimento 1 os dados reprodutivos e produtivos foram extraídos do banco de dados do DHIA,

sendo a base de dados da ABCZ utilizada nos experimentos 2 e 3, assim como de dados das próprias unidades experimentais.

2.4. Análises estatísticas

Em delineamento totalmente casualizado os animais foram alocados para as classes de CFA, AMH e largura vulvar de acordo com suas distribuições de frequência, sendo os efeitos dessas classes sobre a reprodução e CCS avaliados pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Foram também avaliados os efeitos de raça sobre a CFA, CCS, AMH e largura vulvar.

Todas as análises foram realizadas pelos pacotes estatísticos SAS[®] e JMP[®] (Cary, NC, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de distribuição pelo procedimento UNIVARIATE e ajustados para se adequarem às análises específicas. Esse mesmo procedimento foi utilizado para a criação de classes de CFA, largura vulvar e AMH, que foram estabelecidas para avaliar o desempenho reprodutivo e status da glândula mamária dependente da CCS (ocorrência de mastite e CCS propriamente dita). O efeito de raça sobre a largura vulvar e CFA foi submetido à análise de variância pelo procedimento

GLM e as médias comparadas pelo teste *t* de *student*. O procedimento REG foi utilizado para analisar a relação entre AMH e CFA. Os efeitos fixos das classes de AMH, CFA e largura vulvar sobre as variáveis IDP, CCS, ocorrência de mastite e número de serviços por concepção foram determinados pelo procedimento GLIMMIX após a pré-definição da natureza da distribuição e/ou transformação e normalização da variável resposta. O termo de erro foi animal dentro de cada classe. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas com $P < 0,05$ e tendências com $P < 0,10$.

3. Resultados e Discussão

Experimento 1

A largura vulvar foi normalmente distribuída para as raças Holandês e Jersey, sendo os valores de P no teste de Shapiro-Wilk de 0,14 e de 0,56, respectivamente. A média, mediana, moda e intervalo da largura vulvar para a raça Holandês foram 6,78, 6,50, 6,00 cm e de 4,00 a 10,00 cm; e para a raça Jersey foram 6,59, 6,75, 7,00 e de 4,5 a 9,0 cm, respectivamente. Comparados com raças zebuínas em estudos prévios (Mesquita et al., 2016), esses valores são inferiores, além de indicarem

menor variabilidade, sendo possível que indiquem a consequência de seleção para tipo muito anterior em raças europeias, levando a populações mais homogêneas quanto a aspectos de morfologia exterior com possíveis reflexos na genitália interior. Apesar da diferença de porte entre as raças Jersey e Holandês, as medidas médias de largura vulvar não diferiram ($P = 0,57$), em função de coeficientes de variação igualmente próximos de 20,58 e 17,46% para Holandês ($6,78 \pm 0,18$) e Jersey ($6,59 \pm 0,28$) para amostras relativamente reduzidas de 57 e 22 vacas, respectivamente. Considera-se importante relatar e discutir dados de distribuição dessa variável uma vez que é, para nosso conhecimento, a primeira descrição da mesma nessas raças. A hipótese é a de que essa medida, de fácil execução e acesso, reflita o tamanho da genitália interna, principalmente ovários, e com isso estabeleça-se uma relação com a funcionalidade dos mesmos, baseando-se em evidências anteriores (Mesquita et al., 2016); embora nesse estudo, medidas de genitália interna não tenham sido tomadas por que demandaria um tempo incompatível com a intervenção no manejo de rebanhos em atividades de produção.

As concentrações de AMH e CFA foram positivamente correlacionadas nas raças Holandês ($r = 0,66$; $P < 0,0001$) e Jersey ($r =$

0,68; $P = 0,0005$), respectivamente (Figuras 1 e 2). Sabe-se que em bovinos a CFA e concentração de AMH têm correlação positiva (Ireland et al., 2008). Corroborando os resultados acima, Baldrighi et al. (2014) também encontraram correlação positiva para a raça Holandês. Esses achados reforçam os dados revisados quanto à ligação clara entre as concentrações de AMH e uma característica indicativa de superioridade reprodutiva via funcionalidade ovariana, sendo essa relação ligeiramente mais alta na raça Jersey, cujo efeito de heterose com a raça Holandês melhora a fertilidade em relação à essa última (Buckley et al., 2014).

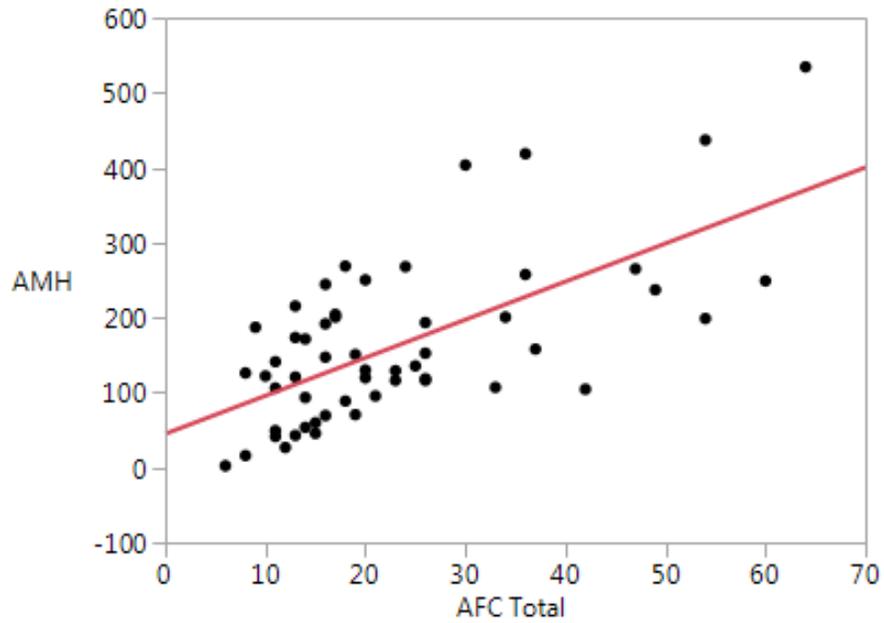


Figura 1. Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-pg/mL) e contagem folicular antral (CFA) para a raça Holandês (n=57).

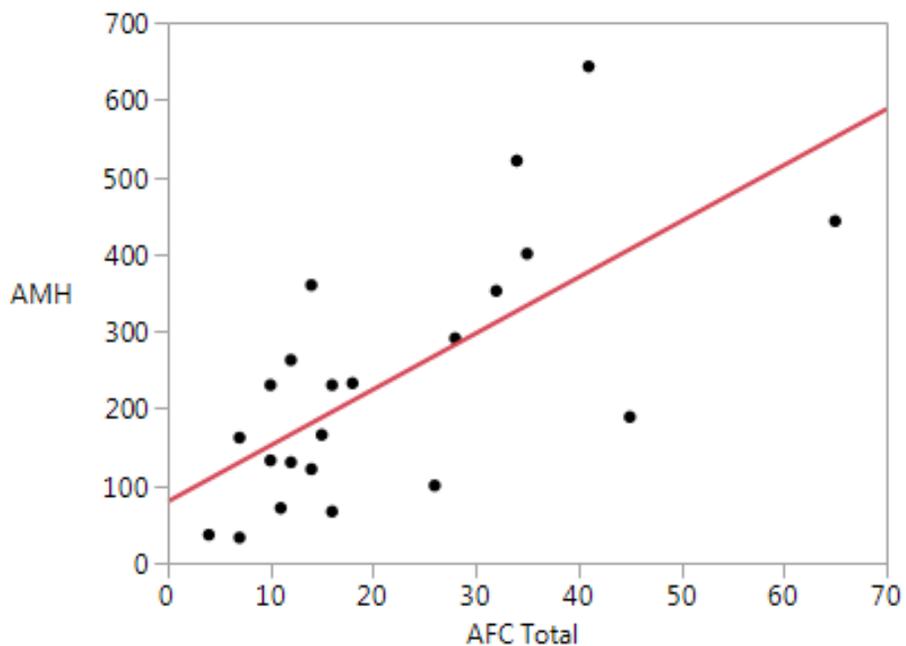


Figura 2. Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-pg/mL) e contagem folicular antral (CFA) para a raça Jersey (n=22).

Houve diferença significativa ($P < 0,02$) na média de concentração de AMH entre os dois grupos genéticos, sendo que para a raça Jersey ($0,24 \pm 0,03$ ng/ml) foi maior que para a raça Holandês ($0,16 \pm 0,02$ ng/ml). Em outro estudo vacas Jersey também tiveram concentrações de AMH maiores ($P \leq 0,05$) do que Holandês (Ribeiro et al., 2014).

Considerando as vacas de ambas as raças (n = 79), foi encontrada correlação positiva entre CFA e largura vulvar ($r = 0,26$; $P = 0,02$) e entre

CFA e AMH ($r = 0,62$; $P < 0,0001$). Quando foram observadas as raças separadamente, houve uma tendência ($r = 0,25$; $P < 0,06$) entre CFA e largura vulvar para Holandês, porém para Jersey não houve correlação. O motivo pelo qual não houve correlação para Jersey pode ser ligado ao número baixo de observações para essa raça ($n = 22$), pois, conforme relatado anteriormente nesse estudo, a natureza de distribuição e de valores das medidas amostradas das duas raças são bastante semelhantes, em que pese a diferença de porte. Mesquita et al. (2016) encontraram, na raça Tabapuã, correlação positiva entre CFA e largura de vulva relativa, ou seja, animais com maior contagem tinham também maior largura. A diferença, é que no trabalho citado foi realizada medida relativa, na qual a largura vulvar foi dividida pelo peso corporal do animal, como uma compensação pela variabilidade no porte dos animais daquela raça. Fica notável, então, que é possível que a raça Holandês apresente uma relação mais direta entre tamanho vulvar e da genitália interna, principalmente ovários.

Em relação à reprodução, o intervalo de parto (IDP) foi menor nas classes de AMH alto e largura vulvar alta em relação às baixas (Tabela 1). Quanto às raças, não houve diferença no IDP. O IDP foi mais alto na

classe de CFA alta. O número de serviços por concepção foi semelhante entre as características estudadas (Tabela 1). Corroborando com esse achado de IDP como medida de fertilidade, Ribeiro et al. (2014) também encontraram diferença para o AMH baixo em vacas lactantes, sendo que esses animais tiveram maiores perdas gestacionais entre 30 e 65 dias, assim como as vacas que não ficaram prenhes ao fim da estação de monta também tinham AMH mais baixo quando comparadas às vacas que ficaram gestantes. Ainda, novilhas com AMH mais baixo tiveram menor vida produtiva no rebanho do que novilhas com AMH mais alto, sendo essas fêmeas com AMH menor, consideradas menos férteis (Jimenez-Krassel et al., 2015). Essa é a segunda vez que foi relatado efeito positivo entre IDP e largura vulvar. Maculan et al. (2018), em fêmeas zebuínas de corte, encontraram correlação negativa entre largura vulvar e IDP, isto é, animais com maior largura tinham IDP menor. Os achados desses autores ajudam a suportar a hipótese do presente trabalho, ligando largura vulvar a animais com melhor eficiência reprodutiva. Contrariamente aos achados na literatura (Oliveira et al., 2002) em que o efeito de CFA foi positivo para IDP, ou seja, as vacas com maior número de folículos tinham IDP

menor, no presente experimento o efeito de CFA foi negativo para IDP, esperava-se que animais com IDP menor tivessem CFA mais alta.

Em relação à saúde da glândula mamária, tanto para contagem de células somáticas (CCS) quanto para mastite, não foram encontradas diferenças entre as classes de AMH, raça, CFA e largura vulvar. Esses resultados contestam a hipótese proposta de que as medidas de AMH, raça, CFA e largura vulvar estejam relacionadas com mastite, e que seriam uma forma de estabelecer uma ligação entre reprodução e infecções intra-mamárias. Diferentemente do presente experimento, no qual o IDP como medida direta de fertilidade não foi diferente entre as raças Holandês e Jersey, e também não houve diferença entre essas raças para casos de mastite, Washburn et al. (2002) encontraram, como medida de fertilidade, maiores taxas de concepção e maior porcentagem de vacas gestantes em 75 dias (período correspondente à estação de monta naquela fazenda) nas vacas Jersey. Também, as vacas da raça Holandês tiveram o dobro de casos de mastite clínica do que as Jersey. Alguns estudos que estabeleceram ligações entre reprodução e infecções intra-mamárias são relativas à viabilidade de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* (Rahman et al., 2012; Roth et al., 2013). Além disso, em um estudo foram

utilizadas infecções produzidas artificialmente, resultando em aumento da $PGF2\alpha$, que potencialmente pode piorar índices reprodutivos, tais como taxa de concepção e morte embrionária (Hockett et al., 2000). No presente, a mastite analisada foi de ocorrência natural. Portanto, a ausência de resultados significativos que permitiriam a ligação entre reprodução e mastite pode ser justificada por essa diferença.

Experimento 2

O IDP foi semelhante entre as classes de CFA, sendo que, para a classe de largura vulvar baixa foi menor (Tabela 2). Apesar de o IDP, como característica de fertilidade, ter sido semelhante entre as classes de CFA, em estudo prévio (Ireland et al., 2008), para CFA baixa os números totais de folículos atrésicos e saudáveis, e números de folículos primordiais, transitórios, primários, secundários e antrais morfológicamente saudáveis foram menores, comparados à CFA alta. Porém, os parâmetros desses autores são medidas indiretas de fertilidade. No entanto, assim como no estudo realizado, outros pesquisadores encontraram como medida direta de fertilidade que o intervalo do parto à concepção por IA foi menor em vacas com contagem alta de folículos (*P*

< 0,05) e também uma porcentagem maior de vacas ficaram gestantes à primeira IA na categoria de CFA alta (Martinez et al., 2016). O que pode explicar a diferença desse trabalho para o presente experimento é que aqueles autores trabalharam com maior número de animais.

O intervalo de parto foi menor na classe de largura vulvar baixa (Tabela 2), o que contradiz a hipótese de que animais com largura vulvar maior são mais férteis. Esse achado é diferente do achado dos animais dos EUA, no qual o IDP foi menor para os animais com largura vulvar maior. Isso pode ter acontecido pelo fato de as raças trabalhadas serem diferentes nos dois locais, sendo Holandês e Jersey nos EUA e Girolando no presente local, ou se o percentual das raças fundadoras possa estar influenciando os resultados.

Apesar dos casos de mastite terem sido similares entre as classes de CFA (Tabela 2), a CCS foi diferente ($P < 0,05$), sendo a CCS maior para CFA baixa. Aparentemente, não existe outro estudo mostrando relação direta entre CCS e CFA. Porém, Lavon et al. (2011) fizeram um experimento induzindo 4 ciclos de 7 dias e injetaram na glândula mamária, uma vez somente nesse período (ciclo 1), Salina (grupo controle) ou *E. coli* LPS ou *S. aureus* ex. para induzir mastite. Eles

observaram que animais que receberam *S. aureus* ex. tiveram aumento da CCS e esse tratamento causou um decréscimo no número de folículos desenvolvidos, porém, a infusão de *E. coli* LPS não causou diferença para CCS, tampouco para número de folículos. Esses resultados indicam uma possível relação de contagem folicular com mastite, ao contrário do que foi observado no presente estudo, embora, tenha sido mastite induzida e não de ocorrência natural.

A porcentagem de animais com mastite não foi diferente entre as classes de largura vulvar (Tabela 2), entretanto, os animais com CCS mais alta foram os animais com largura vulvar menor. Esse é o primeiro relato que relaciona CCS e largura vulvar.

Houve correlação positiva ($r = 0,53$; $P < 0,0001$) entre CFA e largura vulvar para os animais Girolando (Figura 3). O único trabalho, segundo a literatura disponível, no qual a CFA e a largura vulvar foram avaliadas, é de Mesquita et al. (2016), que trabalharam com a raça Tabapuã e observaram, como no presente trabalho, correlação positiva entre CFA e largura de vulva relativa. Deve-se considerar, no entanto, que largura relativa não é a medida direta da largura, pois leva em conta a largura vulvar em relação ao peso do animal. No presente estudo não foi

realizada análise em relação ao peso por razões de logística do experimento. Este achado com a raça Girolando está de acordo com o achado do experimento 1 considerando as raças Holandês e Jersey em conjunto. Mais estudos são necessários para poder predizer com mais exatidão a relação entre essas duas medidas.

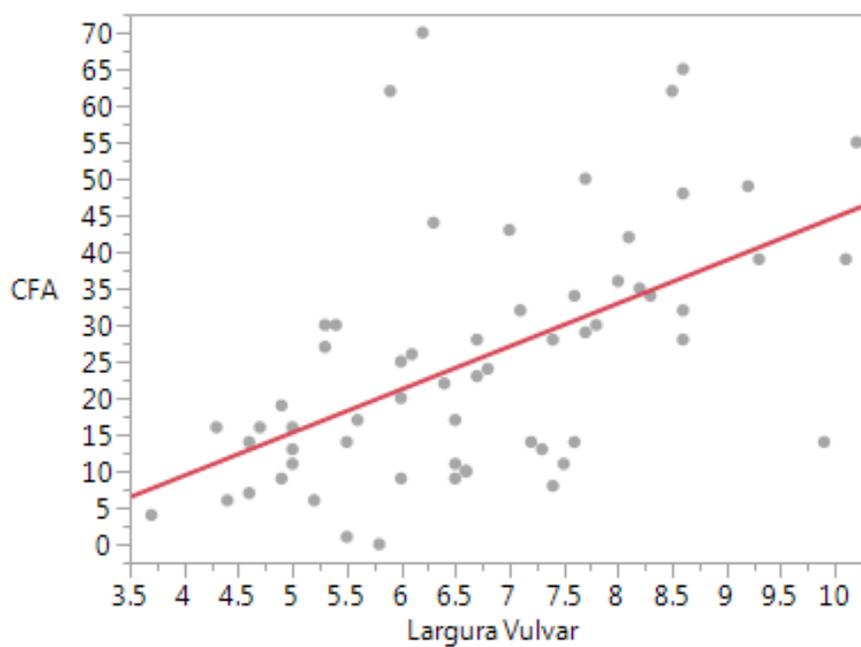


Figura 3. Relação entre contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar (cm) para a raça Girolando (n=80).

Experimento 3

O AMH médio foi $0,58 \pm 0,06$ ng/mL (mediana – 0,45 ng/mL; moda – 0,07 ng/mL; e intervalo 0,026 – 2,262 ng/mL).

A largura vulvar média foi $9,5 \pm 0,3$ cm (mediana – 9,5 cm; a moda – 10,0 cm; e intervalo 5,0 – 13,6 cm).

A contagem folicular antral média foi $33,95 \pm 4,13$ folículos (mediana – 28 folículos; moda – 36 folículos; e intervalo 09 – 145 folículos).

O intervalo de parto médio foi $14,66 \pm 0,37$ meses (mediana – 14 meses; moda – 13 meses; e intervalo 09 – 21 meses).

A idade ao primeiro parto (IPP) média foi $3,86 \pm 0,07$ anos (mediana – 04 anos; moda – 04 anos; e intervalo 03 – 05 anos).

O intervalo de parto (IDP) não foi diferente entre as classes de AMH, idade, CFA e largura vulvar (Tabela 3). Em relação à CFA, esse achado está de acordo com o experimento 2, no qual também não houve diferença, porém contesta o achado do experimento 1, no qual a classe de CFA baixa teve IDP menor. Essas diferenças podem estar relacionadas à raça, sendo em cada experimento uma raça diferente, ressaltando que no presente estudo, a raça é Gir. Em relação à largura vulvar esse resultado

contrasta com os outros dois experimentos, onde no primeiro foi encontrado que a classe de largura vulvar baixa teve IDP maior, e no segundo experimento a classe de largura vulvar baixa teve IDP menor.

A idade ao primeiro parto (IPP) não foi diferente entre as classes de AMH, idade, CFA e largura vulvar (Tabela 3).

Houve correlação ($r = 0,51$; $P < 0,04$) entre AMH e CFA na raça Gir (Figura 4). Esse achado corrobora não somente com os achados do experimento 1, mas também confirma o achado para animais mestiços (Hereford X Angus X Charolais), Holandês, Jersey e mestiços (Holandês-Jersey) e Gir em outros estudos de outros autores (Ireland et al., 2008; Ribeiro et al., 2014; Baldrighi et al., 2014).

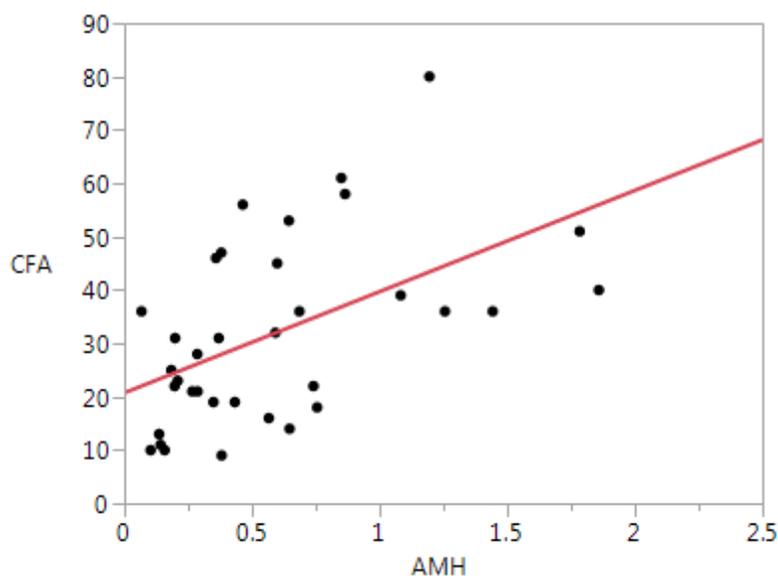


Figura 4. Relação entre concentração sérica de antígeno anti-Mülleriano (AMH-ng/mL) e contagem folicular antral (CFA) para raça Gir (n=39).

A largura vulvar não foi correlacionada com a CFA. Esse resultado contesta o resultado encontrado no experimento 1, quando foram analisadas as duas raças em conjunto (Holandês e Jersey), o resultado do experimento 2 (Girolando), assim como o achado de Mesquita et al. (2016). Portanto, mais estudos são necessários para relacionar largura vulvar e CFA, pois os achados até o momento são parcialmente significativos, sendo um possível motivo, a variação das raças estudadas em todos os trabalhos citados acima.

4. Conclusão

Foram encontradas relações entre as classes de AMH, CFA e de largura vulvar com características ligadas à reprodução e saúde da glândula mamária, o que remete à possibilidade de utilizar esses parâmetros na seleção para reprodução, tanto de raças taurinas como zebuínas, após mais estudos com números maiores de animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, e à Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSSU) e à EPAMIG, onde foram realizados os experimentos.

Referências

Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Post, M., Visser, J.A., De Rooij, D.G., Parvinen, M., Themmen, A.P., Grootegoed, J.A., 1995. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis

development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 136, 5614-5622.

Baldrighi, J.M., Sá Filho, M.F., Batista, E.O.S., Lopes, R.N.V.R., Visintin, J.A., Baruselli, P.S., Assumpção, M.E.O.A., 2014. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 1015-1020.

Buckley, F., Lopez-Villalobos, N., Heins, B.J., 2014. Crossbreeding: implications for dairy cow fertility and survival. *Animal* 8, 122-133.

Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54-62.

Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Shook, G.E., Ruegg, P.L., 2005.

Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology. *J. Dairy Sci.* 88, 804-811.

Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., Fisher, R.A., Bertonis, J.M., Torres, G., Wallner, B.P., Ramachandran, K.L., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., 1986. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45, 685-698.

Gruijters, M.J.G., Visser, J.A., Durlinger, A.L.L., Themmen, A.P.N., 2003. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol. Cell Endocrinol.* 211, 85-90.

Hockett, M.E., Hopkins, F.M., Lewis, M.J., Saxton, A.M., Dowlen, H.H., Oliver, S.P., Schrick, F.N., 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early

lactation. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 241-251.

Ireland, J.J., Scheetz, D.M., Jimenez-Krassel, 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: *Proceedings of The Society for the Study of Reproduction 2010 Annual Meeting. Abstract.*

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.

Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Ireland, J.L.H., Pursley, J.R., Smith, G.W., Tempelman, R.J., Ferris, T., Roudebush, W.E., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is

positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci.* 98, 3036–3045.

Josso, N. 1973. *In vitro* synthesis of Müllerian inhibiting substance hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinology* 93, 829-834.

Lavon, Y., Leitner, G., Moallem, U., Klipper, E., Voet, H., Jacoby, S., Glick, G., Meidan, R., Wolfenson, D., 2011. Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Theriogenology* 76, 942-953.

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. *Anim. Reprod. Sci.* 189, 84-92.

Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J. L., 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 466-475.

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 rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. *J. Reprod. Dev.* 62, 587-590.

Oliveira, J.F.C., Neves, J.P., Moraes, J.C.F., Gonçalves, P.B.D., Bahr, J.M., Hernandez, A.G., Costa, L.F.S., 2002. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Anim.Reprod. Sci.* 73, 1-10.

Rahman, M.M., Mazzilli, M., Pennarossa, G., Brevini, T.A.L., Zecconi, A., Gandolfi, F., 2012. Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95, 1885-1893.

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.-L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.-F., 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.

Roth, Z., Dvir, A., Kalo, D., Lavon, Y., Krifucks, O., Wolfenson, D., Leitner, G., 2013. Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.* 96, 6499-6505.

SAS. 2002. *A Handbook of Statistical Analyses using SAS*, 2nd ed. edn., Boca Raton; London; New York; Washington, D.C.

Vigier, B., Picard, J.Y., Tran, D., Legeai, L., Josso, N., 1984. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114, 1315-1320.

Washburn, S.P., White, S. L., Green, J.T. Jr., Benson, G.A., 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *J. Dairy Sci.* 85, 105-111.

Tabela 1. Efeito de hormônio anti-Mülleriano (AMH), raça, contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar sobre parâmetros de saúde da glândula mamária e reprodução nas raças Holandês e Jersey

Parâmetro	AMH		Raça		CFA		Largura vulvar	
	Baixo	Alto	Holandês (n=57)	Jersey (n=22)	Baixa	Alta	Menor	Maior
IDP ¹	379,69±5,38**	352,68±4,13	361,60±3,50	370,33±6,17	357,95±5,29*	374,10±4,39	372,47±4,85*	359,52±4,57
CCS ²	2,41±0,29	2,18±0,25	2,03±0,20	2,59±0,36	2,19±0,26	2,40±0,31	2,16±0,25	2,44±0,28
Mastite (%)	48,72 (19/39)	45,00 (18/40)	41,03 (16/39)	52,50 (21/40)	41,03 (16/39)	52,50 (21/40)	40,00 (16/40)	53,85 (21/39)
Nº serviço	2,48±0,31	2,01±0,24	2,47±0,21	1,91±0,30	2,13±0,25	2,22±0,27	2,07±0,26	2,27±0,26

**Diferença significativa de $P < 0,0001$

* Diferença significativa $P < 0,05$

¹IDP- intervalo de partos (dias)

²CCS- contagem de células somáticas

AMH (baixo- <150 e alto- ≥ 150 pg/mL); CFA baixa- <17 e alta- ≥ 17 folículos antrais e largura vulvar menor- <7 e maior- ≥ 7 cm

Tabela 2. Efeito das classes de CFA e largura vulvar sobre parâmetros de saúde da glândula mamária e reprodução em vacas Girolando

Parâmetro	CFA (Folículos antrais)		Largura vulvar (cm)	
	Baixa (<25)	Alta (\geq 25)	Menor (<6,7)	Maior (\geq 6,7)
IDP dias ¹	429,14 \pm 3,15	433,57 \pm 4,65	418,96 \pm 3,17*	444,10 \pm 4,58
CCS Células/mL de leite ²	409951 \pm 117,57*	187813 \pm 94,16	352726 \pm 111,05*	218284 \pm 98,59
Mastite (%) ³	36,36 (12/33)	21,43 (6/28)	34,38 (11/32)	24,14 (7/29)

* Diferença significativa $P < 0,05$

¹IDP- intervalo de partos

²CCS- contagem de células somáticas

³Proporção de vacas com contagem média ultrapassando 200.000 células/mL de leite

Tabela 3. Efeito do hormônio anti-Mülleriano (AMH), idade, contagem folicular antral (CFA) e largura vulvar sobre intervalo de parto (meses) e idade ao primeiro parto (anos) na raça Gir

Parâmetro	AMH (ng/mL)		Idade		CFA (Folículos antrais)		Largura vulvar (cm)	
	Baixo (<0,3)	Alto (≥0,3)	Baixa (<8,6)	Alta (≥8,6)	Baixa (<33)	Alta (≥33)	Menor (<9,5)	Maior (≥9,5)
IDP ¹	16,23±1,52	14,48±1,32	15,43±0,81	15,22±2,19	15,28±1,30	15,38±1,63	15,07±1,41	15,60±1,55
IPP ²	3,86±0,20	3,78±0,19	3,89±0,10	3,74±0,32	3,73±0,19	3,91±0,23	3,90±0,18	3,74±0,22

¹IDP- intervalo de partos (meses)

²IPP- idade ao primeiro parto (anos)