



CAROLINA MONTEIRO DA SILVA

**CONTAGENS FOLICULARES OVARIANAS E
SUAS RELAÇÕES COM RIMA VULVAR E
OVÁRIOS DE BOVINOS**

LAVRAS - MG

2014

CAROLINA MONTEIRO DA SILVA

**CONTAGENS FOLICULARES OVARIANAS E SUAS RELAÇÕES COM
RIMA VULVAR E OVÁRIOS DE BOVINOS**

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

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

Coorientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Carolina Monteiro da.

Contagens foliculares ovarianas e suas relações com rima vulvar
e ovários em bovinos / Carolina Monteiro da Silva. – Lavras :
UFLA, 2014.

50 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Classificação folicular. 2. Desempenho reprodutivo. 3.
Marcador. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08926

CAROLINA MONTEIRO DA SILVA

**CONTAGENS FOLICULARES OVARIANAS E SUAS RELAÇÕES COM
RIMA VULVAR E OVÁRIOS DE BOVINOS**

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

APROVADA em 30 de maio de 2014.

Dr.	Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dr.	Antônio Gilberto Bertechini	UFLA
Dra.	Suely de Fátima Costa	UFLA

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Aos meus pais, Luiz Cláudio e Maria de Lourdes,
à minha irmã Bruna, meu filho Luiz Eduardo e
Fidelis meu marido

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por me dar a vida que tenho e a força que sempre encontro nos momentos críticos.

Agradeço aos meus amados pais, Luiz Cláudio e Maria de Lourdes pelo exemplo de vida, pelo esforço e dedicação. Sem isso, nunca teria chegado aonde cheguei. Amo vocês e vou ser-lhes eternamente grata! À minha irmã Bruna, que é minha fonte de amizade. Quando estamos juntas, o mundo corre perigo!

Agradeço ao meu filho Luiz Eduardo, por ser meu amigo e meu companheiro acima de tudo. Por só me dar alegrias, por ser minha fonte de vida, meu tudo e pela paciência quando a mamãe já nem sabia mais o que era isso.

Agradeço a meu amado esposo Fidelis, pelo seu imenso amor, carinho, compreensão, dedicação e claro, paciência. Com você ao meu lado, as dificuldades são mais fáceis de enfrentar. Seu amor me guia! Amo-te!

Aos meus queridos avôs (*in memoriam*), Mozart, Carlos e Amélia pelo carinho e amor que sempre dedicaram a mim enquanto estiveram vivos. A minha vó Iara, por ser meu alicerce e exemplo de mulher a ser seguido. Por ser, acima de tudo, minha grande amiga.

Ao meu querido professor, José Camisão, pelos ensinamentos, pela amizade e carinho.

Aos professores do DMV que muito me auxiliaram: José Rafael, Cristina Delarete e Suelly Costa. Muito obrigada!

Aos amigos que sempre estão ao meu lado, em especial, Paula, Vera, Fernanda e Natália. Com vocês ao meu lado, sinto-me imbatível! Vocês são demais!

Aos amigos que surgiram durante esta caminhada, fica o meu muito obrigada! Ricardo, as risadas que dei contigo são inesquecíveis! Nelson, a sua companhia foi ótima! João, sua presença no laboratório foi maravilhosa.

Adorava trabalhar contigo! Ao meu amigo Alaôr, pelo empenho, amizade e ajuda fundamental! Pelos sábados perdidos comigo no laboratório, sem ganhar nada em troca, só pelo prazer de ajudar. Por ter se tornado meu amigo para todas as horas!

Aos técnicos do DMV, Rodrigues e Vanessa. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, fica o meu mais sincero agradecimento!

OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O desenvolvimento folicular ovariano é usualmente utilizado como uma ferramenta para classificar vacas e novilhas fenotipicamente, podendo esses animais ser agrupados segundo a sua contagem folicular antral (CFA) em classe alta e baixa. A população folicular pré-antral (PFPA) é um indicativo da reserva de folículos do animal. O estabelecimento de uma possível correlação positiva da PFPA com a CFA e com a morfometria da genitália interna e externa poderia indicar animais com capacidade reprodutiva superior de forma relativamente barata, conceito podendo ser útil na seleção para a fertilidade em bovinos. Objetivou-se neste estudo correlacionar a contagem pré-antral com a CFA e com as características morfométricas do trato reprodutivo de fêmeas bovinas. Foram coletados os tratos genitais de 129 fêmeas bovinas sem raça definida (SRD) oriundas de matadouro. Primeiro foram mensurados o comprimento da rima vulvar, a largura vulvar e o comprimento, altura e largura dos ovários. Os ovários (n=98) foram processados histologicamente e corados com Hematoxilina-Eosina e as contagens realizadas sob microscopia óptica. Os folículos foram classificados, de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordial, primário, secundário e terciário) e foi criado um índice geral da proporção de atresicos para normais. As contagens foliculares mais altas foram correlacionadas com a CFA ($p=0.05$, $r^2=0.11$). O número total de folículos pré-antrais foi de $18,61 \pm 1,79$ por $2,23 \text{ mm}^2/\text{ovário}/\text{animal}$ e não foi correlacionado com as medidas do trato genital. Foi encontrada correlação entre as populações foliculares primárias e secundárias ($p=0.0009$) e secundária e terciária ($p=0.0001$), mas não houve correlação entre as populações primordial e primária ($p=0.63$). O índice de atresia foi menor 1.63 ± 0.34 na classe de ovários maiores de três centímetros ($p=0.002$) e mais alto 1.72 ± 0.42 na classe de rimas acima de nove centímetros. Pode-se concluir que há uma associação relativamente fraca entre as contagens foliculares pré-antral total e antral. Considerando somente a morfometria de peças de matadouro, não foram observadas associações com as contagens foliculares pré-antrais. A classificação funcional dos folículos pré-antrais foi associada com tamanho vulvar e ovariano, indicando possíveis relações da morfometria da genitália com a qualidade folicular.

Palavras-chave: Classificação folicular. Desempenho reprodutivo. Marcador.

GENERAL ABSTRACT

Ovarian follicular development is being currently used as a tool to phenotypically classify cows, grouping them according to their antral follicle counts. Antral follicle count (AFC) may be an indicative of the ovarian follicular reserve in cattle. Since AFC only relates to what is seen by ultrasonography, it may not reflect pre-antral follicle populations (PAFC) and follicle functional status accurately. The establishment of possible associations between PAFC, AFC and genitalia morphometrics with superior reproductive capacity may enhance selection for fertility. The aim is to confront PAFC with AFC and reproductive tract morphometric. Slaughter house genital tracts (98) were collected from Holstein/Zebu-crossbred cows and vulvar and tubular structures measured. Antral follicles were counted and, following measurements, ovaries processed histologically. Pre-antral follicles were counted and classified under light microscopy in 12 fields (2 mm²) per ovary. Data was submitted to Smirnov-Kolmorov normality tests and converted to logarithm when necessary. Linear regression analyses were used to assess possible relationships between morphometrics, AFC and PAFC. Follicular counts and measurements were grouped into various classes and submitted to nonparametric analyses by the GENMOD procedure. An atresia index was established based on the ratio of atretic to the total count for each follicle class. Antral follicle counts were positively correlated with PAFC ($p=0.05$, $r^2=0.11$). Overall per/ovary mean PAFC was 18.61 ± 1.79 and was not influenced by tract measurements. Primary, secondary and tertiary follicle counts were positively correlated ($p=0.001$), however, no correlation ($p=0.63$) was found with the primordial population. Atresia was lower in larger ovaries (1.63 ± 0.34) and higher in longer rima vulvae (1.72 ± 0.42). It is concluded that antral follicle counts are related to pre-antral follicle counts. Pre-antral functional classification was related to reproductive tract morphometrics in some aspects, warranting more studies to explain these findings.

Keywords: Reproduction. Ovarian follicular counts. cow genital tract.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Foliculogênese	11
2.2 Atresia Folicular	12
2.3 Classes Foliculares	13
2.4 Contagem Folicular	14
2.5 Histologia	15
2.6 Morfometria do Aparelho Genital da fêmea bovina	16
REFERÊNCIAS	18
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	21
ARTIGO 1 Contagem de folículos ovarianos antrais (AFC) e pré-antrais (PAFC) e morfometria da genitália de bovinos	21

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A reprodução é um dos fatores de importância que determina o sucesso de sistemas de produção de bovinos de leite e de corte. Neste sentido, vários trabalhos vêm sendo realizados a fim de que possam ser selecionados indivíduos com características que melhorem a eficiência reprodutiva. Porém, a utilização de métodos de seleção, muitas vezes, torna-se inviável em virtude dos altos custos e do cenário brasileiro ser, em sua maioria, de pequenos produtores. Em razão disso, a busca por formas alternativas de seleção mais acessíveis se faz necessária em condições de criatórios nacionais.

Dentro deste contexto, a seleção para fertilidade, baseada em características fenotípicas como contagem folicular antral e a sua possível correlação com o tamanho da genitália externa, seria uma ferramenta de baixo custo. Em estudo recente aponta-se para a importância da população folicular antral como marcador de fertilidade em bovinos.

A correlação de populações pré-antrais e antrais, com características da genitália interna e externa, também, pode ser um componente relevante na seleção para fertilidade. Portanto, é necessário investigar se a população folicular, como um todo, pode ser o reflexo do potencial reprodutivo de fertilidade superior.

O maior número de folículos antrais pode estar relacionado a falhas nos mecanismos de dominância folicular e, principalmente, em espécies mono ovulatórias, como os bovinos, representar potencialmente uma fertilidade mais baixa. Essas são perguntas, ainda, sem dados científicos para respondê-las, o que leva à necessidade de estudos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Foliculogênese

Durante a fase fetal, ocorre a migração das células germinativas primordiais do saco vitelino para as gônadas em formação originando, assim, as oogônias, que, após se diferenciar em ovócitos, irão constituir os folículos primordiais. Esse processo é conhecido como foliculogênese (ROSSETO et al., 2011). Considera-se o folículo a unidade morfológica e funcional do ovário, tendo como função proporcionar ao oócito um ambiente favorável para o seu crescimento e maturação. O folículo ovariano é formado por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais) (REYNAUD et al., 2009).

A população folicular ovariana possui uma grande variação individual (entre 0 a 720.000). Fatores como raça, espécie (CAHILL; MARIANA; MAULÉON, 1979), genética, idade, estado sanitário, clínico e reprodutivo (BETTERIDGE et al., 1989) influenciam ainda mais essa diferença (FERRAZ, 2008).

O desenvolvimento folicular em ruminantes acontece em ondas e cada uma pode ser dividida em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Com o aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, ocorre um estímulo para o recrutamento folicular e, então, o evento da emergência acontece (MCGEE; HSUEH, 2000). Dentro desse grupo, um folículo será selecionado e irá adquirir a capacidade ovulatória. O mecanismo de seleção folicular, ainda, não está totalmente esclarecido, mas alguns fatores como: tamanho folicular, esteroidogênese (especialmente a produção de estradiol), capacidade de resposta ao FSH e LH (número de receptores para essas gonadotrofinas) e diversos fatores locais, como o IGF-I podem estar relacionados a esse processo (MAYER et al., 2004). O

folículo dominante irá suprimir o crescimento dos outros folículos, por meio da secreção de estradiol e inibina, que inibem a liberação de FSH pela hipófise e como consequência os folículos subordinados não irão conseguir se desenvolver, entrando em um processo chamado de atresia (LANNA, 2009). Durante o processo de foliculogênese, o oócito cresce e as células da granulosa se multiplicam e se diferenciam da forma pavimentosa para cúbica e adquirem, também, a capacidade esteroidogênica (FORTUNE, 2003). A ocorrência do crescimento folicular acontece durante toda a vida do animal ou até a reserva de folículos primordiais se esgotar (CHAVES et al., 2010).

2.2 Atresia Folicular

O ovário bovino neonato possui uma reserva de, aproximadamente, 200.000 folículos primordiais por ovário (ERICKSON, 1986) que, ao iniciar o seu desenvolvimento, terá apenas dois destinos finais: irá crescer até ocorrer a ovulação ou sofrerá atresia (morte folicular programada ou apoptose). Aproximadamente 99,9% desses folículos são eliminados pelo processo da atresia (SILOTO, 2012), que pode ocorrer em qualquer momento do desenvolvimento folicular, sendo o índice de atresia variável, independente do estágio folicular (FORTUNE, 1994). Portanto, os índices de folículos que ovulam durante a vida reprodutiva da vaca ficam em torno de 0,1%. Em decorrência desse fenômeno, ocorre uma diminuição drástica dos folículos que irão ovular, reduzindo a capacidade reprodutiva do animal (FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

2.3 Classes Foliculares

O folículo primordial apresenta o oócito quiescente na forma ovoide ou esférica, com um citoplasma muito homogêneo e um núcleo grande e, geralmente, excêntrico (LUCCI et al., 2001).

Os folículos primários apresentam oócitos comumente esféricos, podendo ser possível visualizar alguns poucos alongados. O seu citoplasma ocupa todos os espaços entre o oócito e as células da granulosa e, muitas vezes, o citoplasma invade o espaço entre duas células da granulosa (ROSSETO et al., 2011).

A formação do folículo secundário é resultado da proliferação das células da granulosa. Estes folículos contêm, em seu interior, um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica, e, também nesta fase, ocorre o aparecimento da zona pelúcida em volta do oócito (MOREIRA, 2005). Ocorre uma mudança na posição do núcleo do oócito que passa a ser excêntrico (SILVA et al., 2002).

As células da teca externa começam a se formar, com base no estroma intersticial (HURK; ZHAO, 2005) e a teca interna se define quando os folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI et al., 2001).

Os folículos antrais possuem uma cavidade chamada antro. Esta é formada, quando as células da granulosa se dividem e formam uma área que será, posteriormente, preenchida por fluido folicular (REYNAUD et al., 2009). Substâncias reguladoras provenientes do sangue e secreções das células foliculares (gonadotrofinas, esteroides e fatores de crescimento) formam o fluido folicular (MAGALHÃES et al., 2010).

A dependência de gonadotrofinas desencadeia os mecanismos de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (HURK; ZHAO,

2005), assim como a presença de peptídeos sintetizados localmente desempenha um papel-chave na regulação da fase antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos como endócrinos (FORTUNE, 2003).

As células tecais passam por alterações morfológicas e, também, funcionais. Aquelas que se localizam próximas da membrana basal são chamadas de teca interna e as próximas à periferia são conhecidas como teca externa. Ocorre uma diferenciação das células da granulosa em célula do *cumulus* na sequência normal de eventos do desenvolvimento folicular (CHAVES et al., 2010).

2.4 Contagem Folicular

A contagem folicular antral é utilizada como uma importante ferramenta para avaliar e demonstrar a eficiência reprodutiva do animal. A quantidade de folículos antrais é, positivamente, associada com a fertilidade em várias espécies. Por outro lado, a contagem pré-antral somente é aplicada em estudos científicos, sendo sua correlação com a CFA, geralmente, positiva (CUSHMAN et al., 2009; IRELAND et al., 2009).

Os folículos pré-antrais são reflexos da renovação contínua de folículos no ovário (SILOTO, 2012). A sua mensuração e análise morfológica podem indicar a quantidade e a qualidade da reserva folicular do animal e determinar a capacidade reprodutiva do mesmo (IRELAND et al., 2009). Foi demonstrado que a contagem de folículos pré-ovulatórios, em resposta à superovulação, reflete o tamanho da reserva de folículos primordiais e terciário. Vacas com resposta superovulatória mais baixa tiveram menos de folículos primordiais e terciários (CUSHMAN et al., 1999).

Na literatura é citado que a diferença entre os resultados obtidos na contagem folicular se deve aos diferentes estádios do ciclo estral, idade, nutrição

e escore de condição corporal. No trabalho de Cushman et al. (2009), verificou-se que em vacas de corte o número de folículos antrais aumenta até os cinco anos de idade e depois declina, modificando-se o conceito postulado anteriormente de que este decréscimo começaria mais tardiamente.

Objetivando determinar se variações na CFA de bovinos influenciam a função, desenvolvimento folicular e qualidade oocitária, Ireland et al. (2009) observaram influência da CFA sobre a produção de estradiol intrafolicular e sobre a expressão de genes ligados ao metabolismo do FSH.

A CFA foi associada com as concentrações de AMH no sangue de novilhas. As classificações fenotípicas de novilhas baseadas na CFA em conjunto com AMH foram preditivas do número de folículos e oócitos saudáveis (IRELAND et al., 2008).

2.5 Histologia

Para a avaliação de folículos pré-antrais, a histologia é uma ferramenta de suma importância (LANNA, 2009). A principal característica da técnica histológica é a de possibilitar que um grande número de folículos seja avaliado. Isto a torna uma técnica importante, quando se deseja realizar uma análise quantitativa e morfológica, pois auxilia na visualização das quantidades e da morfologia folicular, possibilitando a classificação do tipo de folículo encontrado. A histologia, também, permite a análise da integridade do oócito e das células da granulosa (MATOS et al., 2007), e a classificação ocorre conforme suas características morfológicas e segundo sua fase de desenvolvimento (REYNAUD et al., 2009).

Dentro das técnicas histológicas, a coloração hematoxilina-eosina é a mais indicada para análises morfológicas de folículos ovarianos. Por meio dessa coloração, é possível a classificação morfológica dos folículos, de acordo com o

estádio de desenvolvimento. Os folículos são classificados, de acordo com a morfologia das células da granulosa (esféricas ou cúbicas) e da quantidade de camadas celulares (primários secundários e terciários). Possibilita a identificação de indicadores de atresia.

Em folículos atrésicos são visualizadas deformidades do contorno das membranas citosólica e nuclear, além da presença de picnose celular, sendo o folículo considerado atrésico, somente quando possuir mais de dois indicativos (MATOS et al., 2007).

2.6 Morfometria do Aparelho Genital da fêmea bovina

A fissura vulvar (*rima vulvae*) possui de 7 a 10 centímetros de comprimento, sendo formada por lábios pudendos (*lábua vulvae*). Exibe uma estrutura de dobras espessas que medem de 1 a 2 centímetros com pelos curtos. Há a presença de várias glândulas sebáceas e sudoríparas (OLBRYCH; SZARA, 2011). A pele dos lábios pudendos é composta de tecidos elásticos, separados, principalmente, por revestimento adiposo.

A vulva possui lábios enrugados e grossos, a comissura ventral é pontiaguda e possui diversos pelos longos e estão situados, aproximadamente, cinco centímetros caudais e à mesma distância ventralmente ao nível do arco isquiático (GETTY et al., 2008).

Os ovários são órgãos pares do sistema reprodutor feminino, responsáveis pela produção de gametas e hormônios, principalmente estrógeno e progesterona, possuindo uma localização e tamanhos variados entre as espécies e não possuem relação proporcional com o tamanho corpóreo (NASCIMENTO et al., 2003). O tamanho dos ovários sofre influência, também, pelo período do ciclo estral, estágio de prenhez, idade e condições gerais do animal (MCENTEE, 1990).

Nos bovinos, são geralmente na forma ovoide e irregular (GETTY et al., 2008), medem em média de 3,0 a 4,5 cm de comprimento com 1,5 a 2,0 cm de largura (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

REFERÊNCIAS

- BETTERIDGE, K. J. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 38, p. 87-98, 1989.
- CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 55, p. 27-36, 1979.
- CHAVES, R. N. et al. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 37-49, jan./mar. 2010.
- 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 of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1971-1980, June 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, Feb. 1999.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 701 p.
- ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinology**, New York, v. 4, p. 233-254, 1986.
- FERRAZ, M. L. **Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008.
- FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. 234 p.
- FORTUNE, J. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3/4, p. 135-163, Oct. 2003.

- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 50, n. 2, p. 225-232, Feb. 1994.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 83, n. 82, p. 109-126, 2004.
- GETTY, R. et al. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1, 893 p.
- HURK, R. van den; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, Apr. 2005.
- IRELAND, J. L. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, Sept. 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, Jan. 2009.
- LANNA, M. F. **Estudo morfométrico do desenvolvimento folicular ovariano de camundongas albino suíço**. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 61-69, 2001.
- MAGALHÃES, D. M. et al. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 171-182, 2010.
- MATOS, H. M. T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 4, n. 31, p. 433-442, 2007.
- MAYER, L. P. et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 1, p. 130-138, July 2004.

MCENTEE, K. **Reproductive pathology of domestic mammals**. San Diego: Academic, 1990. 401 p.

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

MOREIRA, C. F. **Classificação morfométrica e contagem de folículos ovarianos e recuperação embrionária de gatas domésticas (*Felis catus* - *linneaus*, 1758) suplementadas com taurina**. 2005. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

NASCIMENTO, A. A. et al. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 126-132, jan. 2003.

OLBRYCH, K.; SZARA, T. Morphology of external female reproductive organs in European bison (*Bison bonasus* L.). **European Bison Conservation Newsletter**, Warsaw, v. 4, p. 55-62, 2011.

REYNAUD, K. et al. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 174-179, Apr. 2009.

ROSSETO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasileira**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.

SILOTO, L. S. **Comparação entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de fêmeas *Bos indicus* e $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* x *Bos taurus***. 2012. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Londrina, Londrina, 2012.

SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 12, n. 2, p. 105-117, 2002.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 Contagem de folículos ovarianos antrais (AFC) e pré-antrais (PAFC) e morfometria da genitália de bovinos

Silva, C. M.¹

De Souza, J.C.²

Mesquita, N. F.³

Rodrigues, P.G.⁴

¹Ma. Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

² Professor- Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

³ Me. Departamento de Zootecnia Universidade Federal de Lavras.

⁴ Professor- Departamento de Zootecnia Universidade Federal de Sergipe.

Artigo formatado de acordo com as normas periódico ANIMAL REPRODUCTION.

Ovarian Antral (AFC) and Pre-Antral Follicle Counts (PAFC) and Genitalia Morphometrics in Cows

ABSTRACT

Ovarian follicular development is being currently used as a tool to phenotypically classify cows, grouping them according to their antral follicle counts. Antral follicle count (AFC) may be an indicative of the ovarian follicular reserve in cattle. Since AFC only relates to what is seen by ultrasonography, it may not reflect pre-antral follicle populations (PAFC) and follicle functional status accurately. The establishment of possible associations between PAFC, AFC and genitalia morphometrics with superior reproductive capacity may enhance selection for fertility. The aim is to confront PAFC with AFC and reproductive tract morphometrics. Slaughter house genital tracts (98) were collected from Holstein/Zebu-crossbred cows and vulvar and tubular structures measured. Antral follicles were counted and, following measurements, ovaries processed histologically. Pre-antral follicles were counted and classified under light microscopy in 12 fields (2 mm²) per ovary. Data

was submitted to Smirnov-Kolmorov normality tests and converted to logarithm when necessary. Linear regression analyses were used to assess possible relationships between morphometrics, AFC and PAFC. Follicular counts and measurements were grouped into various classes and submitted to nonparametric analyses by the GENMOD procedure. An atresia index was established based on the ratio of atretic to the total count for each follicle class. Antral follicle counts were positively correlated with PAFC ($p=0.05$, $r^2=0.11$). Overall per/ovary mean PAFC was 18.61 ± 1.79 and was not influenced by tract measurements. Primary, secondary and tertiary follicle counts were positively correlated ($p=0.001$), however, no correlation ($p=0.63$) was found with the primordial population. Atresia was lower in larger ovaries (1.63 ± 0.34) and higher in longer rima vulvae (1.72 ± 0.42). It is concluded that antral follicle counts are related to pre-antral follicle counts. Pre-antral functional classification was related to reproductive tract morphometrics in some aspects, warranting more studies to explain these findings.

Keywords: Reproduction, ovarian follicular counts, cow genital tract

INTRODUCTION

Reproduction is one of the many relevant factors that determine the success of beef and dairy production systems. In this sense, various experiments have been carried out towards the identification of individuals with traits that may be related to reproductive efficiency, other than genomics. This identification should be feasible under Brazilian conditions, especially with respect to cost. Under Brazilian field conditions, external vulvar size has been used by beef cattle breeders as a selection tool, which emphasizes larger sizes as a more desirable female for reproduction.

Recent studies have underlined the importance of antral follicle populations as a fertility marker in bovine females. However, aspects relative to either reproductive tract morphometrics or pre-antral follicle reserve functional characteristics and their possible associations with the antral population need to be further investigated. Thus, the correlation between pre-antral, antral and genital tract morphometrics may become of relevance in the selection of higher fertility cows, especially under field conditions (Mesquita, 2014).

The objective is to investigate the possible interactions between the antral and pre-antral follicle populations and reproductive tract morphometrics in cows. The hypotheses tested were: "reproductive tract measurements indicate differential ovarian follicle counts" and "greater pre-antral follicle counts indicate higher antral follicle count".

MATERIAL AND METHODS

Procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee - UFLA

Animals

The genital tracts n=98 of predominantly Holstein-Zebu crossbred cows slaughtered at a regional abattoir in Campo Belo – Minas Gerais were collected between the May and June, 2013. Morphometrics were performed according to Mesquita (2014).

Histology

Ovaries were washed in a 0.9% saline solution immediately after slaughter and placed into Bouin's solution (Saturated picric acid solution- 750mL, 36-40% Formaldehyde- 250 mL and glacial acetic acid- 50 mL) at the Histology Laboratory of UFLA. Next, samples were dehydrated in ethanol, diaphonized in xylol and embedded in paraffin. Serial 7µm slices in width were obtained at a rotating microtome (Leica®), from equidistant portions of the ovaries. Slides were mounted and stained with hematoxylin-eosin (HE) according to Moreira (2005). Right and left

ovaries were chosen alternatively as tracts were processed, so that, half of the processed samples were from each side.

Twelve fields were photographed from different areas of each sample and analyzed with the AnalySIS Get IT software. An area equivalent to 2.74 cm^2 was analyzed per ovary (each photo covered 228.57 mm^2 of ovarian tissue).

Follicle Count and Classification

Follicle counts and classifications according to putative functional status were performed by observer. Only follicles with a visible nucleus were considered. Follicles were classified in classes as primordial, primary, secondary and tertiary according to Erickson (1986) and the following subclasses:

- 1- Primordial follicles (PF): oocyte surrounded by a single layer of flattened granulosa cells;
- 2- Activated primordial follicle (APF): presence of one or more cuboidal cells around the oocyte;
- 3- Primary follicle (PRF): complete single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte ;

- 4- Transitional primary follicle (PRFT): presence of an initial second layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte;
- 5- Secondary follicle (SF): two complete layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte;
- 6- Transitional secondary follicle (SFT): presence of an initial third layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte
- 7- Tertiary follicle (TF): Three or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte and absence of any trace of an antrum;

Within any of these subclasses, two functional statuses were established, based on the presence or not of nuclear apoptosis, irregular shape and pyknosis: normal and atretic, such that, 14 functional subclasses were possibly counted. The total counts for each class were used for analyses.

Atresia index

The total atretic follicle number was divided by the total count in each class, thus establishing an index that considered the ratio of

atretic:total count. Indexes of 0.0 and 0.5 indicated 0.0 and 50% of atresia. An index of 1.0, indicated equal proportions of atretic to normal follicles. Indexes above 1.0 indicated higher atretic proportions, and considering the database of the present experiment, reached a maximum value of 15.5, when a proportion of 31 atretic to two normal follicles was observed.

Statistical analyses

For statistical analyses several follicular population classes and/or subclasses and genital tract measurements were grouped based on their distribution:

Antral follicle count (AFC)= sum of all visible surface follicles counted on the whole ovary

Total pre-antral count (PAFC)= sum of all structures observed in all classes and subclasses.

Total pre-antral group (TPAG)= total pre-antral counts below or equal to 30 (TPAG1) or above 30 (TPAG2);

Ovarian length group (OL)= ovarian lengths smaller than or equal to 3 cm (OL1) and greater than 3 cm (OL2);

Ovarian width group (OW)= ovarian widths lesser than or equal to 7 cm (OW1) and greater than 7 cm (OWG2);

Rima vulvae length (RVL)= rima vulvae smaller than or equal to 9 cm (RVL1) and greater than 9 cm (RVL2);

A genital tract fat score was proposed, such that scores 1, 2 and 3, indicated, respectively, no fat, moderate fat and large amount of fat surrounding the genital tract. This scoring was based on the averaged judgment of three previously trained observers, after examined the tracts directly in the laboratory.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with SAS[®] (SAS, Cary, EUA). Data were submitted to the Univariate procedure to test for normality according to the Kolmogorov-Smirnov test and converted to logarithm when necessary. Follicle counts were regressed into morphometric measurements, as well as, counts for each class were regressed into each other using the PROCREG procedure. The various groups were submitted to the GENMOD procedure, considering binomial

or Poisson distributions, according to the distributions of each response variable, as defined by the Univariate procedure. When necessary, the *pscale* option was used to adjust the model according to the goodness of fit test. Unpaired T tests were used to test mean differences.

The GLM procedure was used to generate least square means and mean standard errors. The significance level was set at 5%.

RESULTS

The total pre-antral follicle count population was distributed as a typical Poisson curve (Figure 1).

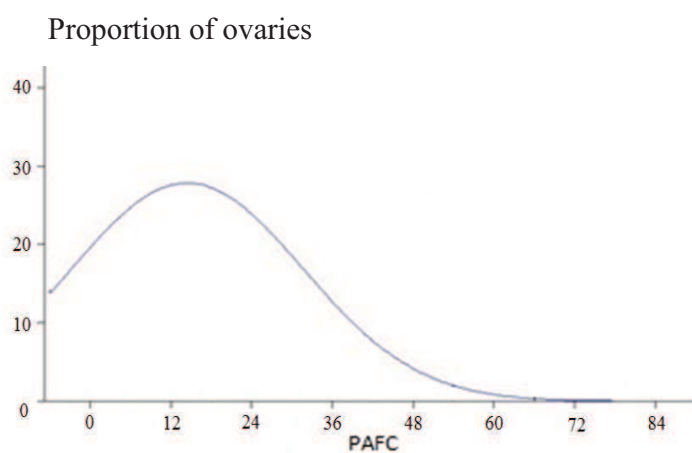


Figure 1- Distribution of the total pre-antral follicle counts.

A sample comprising 2.7 cm² of either the left or the right ovary was actually counted in abattoir material derived from Holstein/Zebu crossbred cattle. This count included all pre antral structures with a visible nucleus observed under 12 individual 228.57 mm² fields per ovary.

PAFC- total pre-antral follicle count

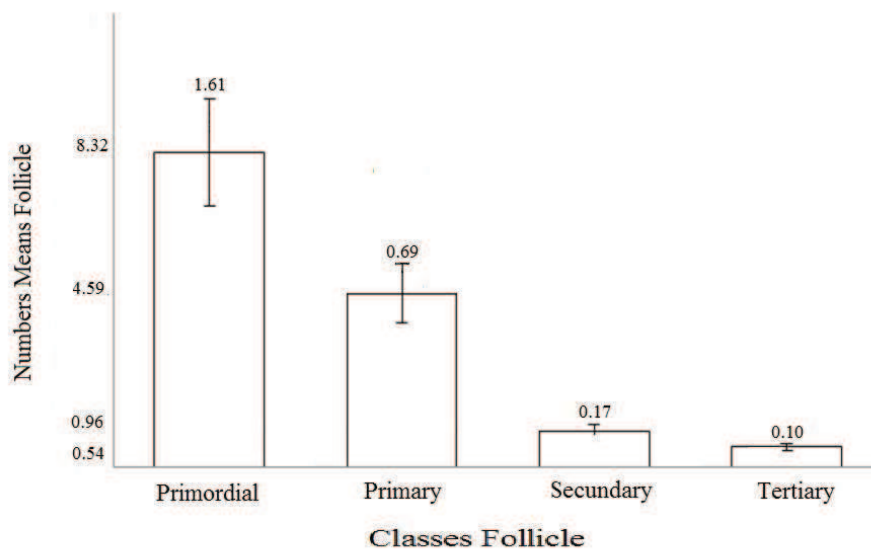


Figure 2 – Mean counts of pre-antral functional classes in bovine ovaries¹. Numbers are least square means and standard errors of the mean (SEM).¹ A sample comprising 2.7 cm² of either the left or the right ovary was actually counted in abattoir material derived from Holstein/Zebu crossbred cattle. This count included all pre antral structures with a visible nucleus observed under 12 individual 228.57 mm² fields per ovary. A total of 98 ovaries were sampled.
² Classified according to Erickson (1986).
³ Means are least square means generated by the GLM procedure of SAS[®].

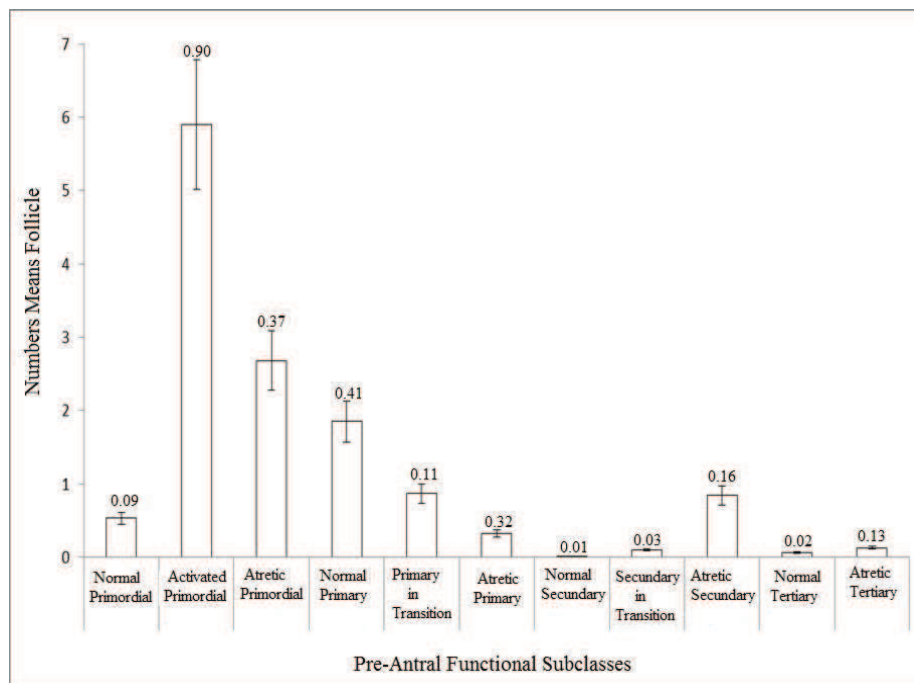


Figure 3 – Mean counts of pre-antral functional subclasses in bovine ovaries¹. Numbers are least square means and standard errors of the mean (SEM)

1 A sample comprising 2.7 cm² of either the left or the right ovary was actually counted in abattoir material derived from Holstein/Zebu crossbred cattle. This count included all pre-antral structures with a visible nucleus observed under 12 individual 228.57 mm² fields per ovary. A total of 98 ovaries were sampled.

2 Classified according to Erickson (1986) modified by a further subdivision in normal or atretic, based on the presence or not of nuclear apoptosis, irregular shape and pyknosis

3 Means and SEMs are least square means and standard errors of the mean generated by the GLM procedure of SAS[®]

*non-activated

No correlations were found between rima vulvae and ovarian measurements and pre-antral class and subclass counts. Functional subclasses and antral follicle counts were not correlated, however, after logarithmic conversion, total pre-antral counts were positively correlated ($p=0.05$, $r^2=0.04$) to antral follicle counts (Figure 4).

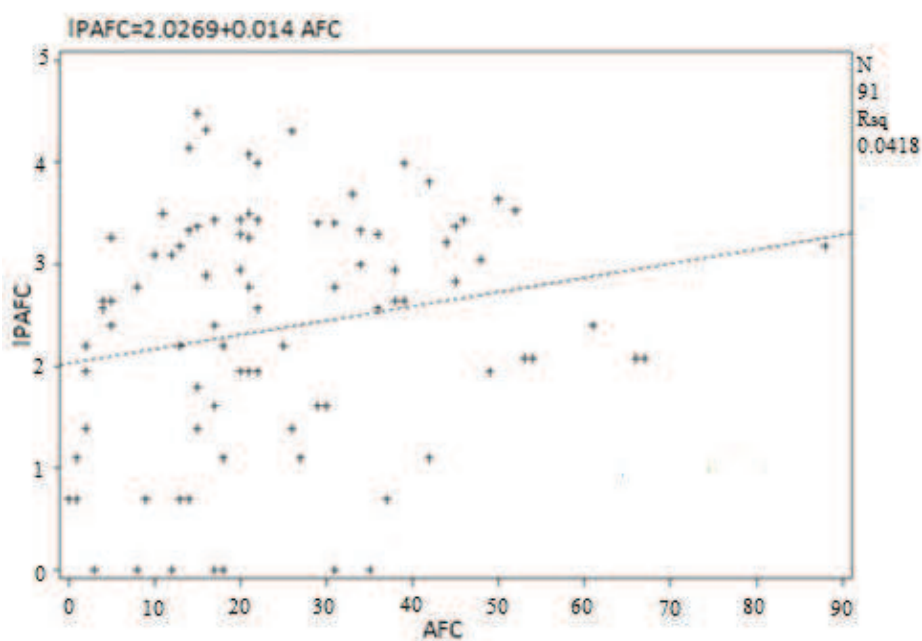


Figure 4- Pre-antral (logarithm converted) and antral follicle counts in bovine ovaries.

IPAFC: total pre-antral follicle count logarithm; AFC: antral follicle count; N: 91; r^2 : 0.04; $p=0.05$

There was a positive correlation between total primary and secondary follicle class counts ($p=0.0009$, $r^2=0.11$; figure 5) and between secondary and tertiary class counts ($p=0.0001$, $r^2=0.31$; figure 6). There was no correlation ($p=0.63$) between total primordial and any of the other classes.

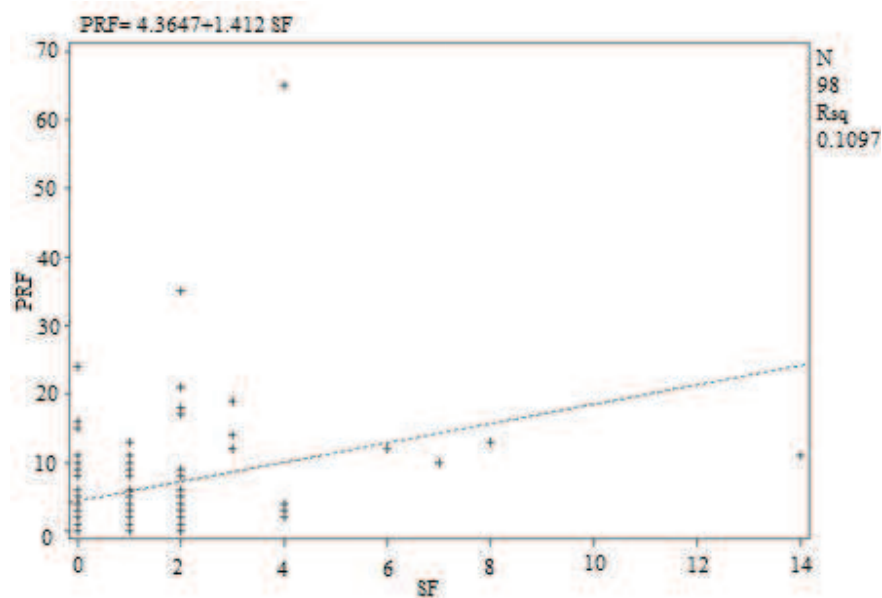


Figure 5-Total primary and secondary pre-antral follicle counts in bovine

ovaries PRF: Total primary counts; SF: Total secondary counts; N: 98;

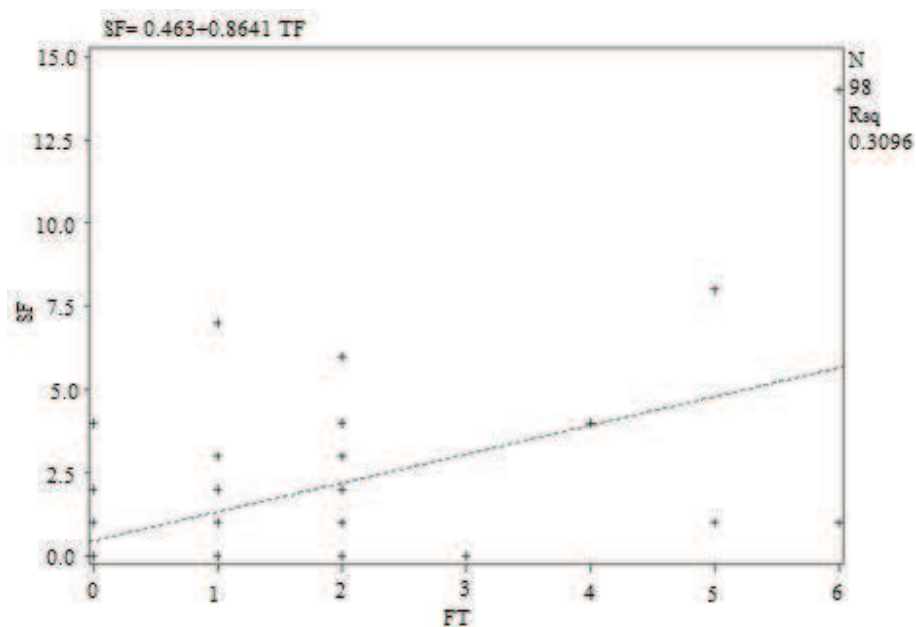


Figure 6- Total secondary and tertiary pre-antral follicle counts in bovine ovaries

SF: Total pre-antral secondary follicle counts; FT: Total tertiary follicle counts; N: 98; $r^2=0.3$;

The total pre-antral follicle count was not influenced by ovarian length ($p=0.23$), with ($p=0.63$) and rima vulvae length ($p=0.74$).

The atresia index was not affected ($p=0.48$) by total pre-antral counts nor by pelvic fat score ($p=0.36$), but was associated to ovarian ($p=0.002$) and rima vulvae length ($p=0.01$), such that smaller ovaries had

higher atresia than smaller ovaries and smaller rima vulvae had lower atresia indexes (Table 1).

Table 1- Ovarian and rima vulvae lengths and atresia index in bovine ovaries

Structure	Class	Length	N	Atresia Index	SEM	Probability
Ovary	1	≤3 cm	47	1.63	0.34	0.002
	2	>3cm	47	0.93	0.34	
Rima vulvae	1	≤9cm	64	1.07	0.29	0.011
	2	>9cm	30	1.72	0.42	

DISCUSSION

Total pre-antral follicle count, similarly to those related to each developmental stage, was non-normally distributed, and best fitted by a Poisson distribution (Portnoi, 2007). This distribution pattern was observed by other authors in bovine ovaries when counting bovine pre-antral (Cushman et al., 1999; Ireland et al. 2009) and antral follicles (Mesquita, 2014). Similar distributions were also reported in bovine *in vivo* embryo production (Sales et al. 2008) and *in vitro* studies (López et al, 2013; Ferreira, 2011).

With respect to the follicle counts reported in this experiment and in those found in the literature, it is important to underline that, for effective and meaningful comparisons between different studies, the methodologies adopted must be considered carefully, especially those related to the ovarian area actually covered in the counting process. Thus, areas of ovarian tissue studied should be as similar as possible to avoid discrepant comparisons. Not always, the described methods allow for reasonable comparisons. Apparently, the total pre-antral follicle counts observed in this experiment were lower than those observed elsewhere (Erickson, 1986; Cushman et al., 1999; Ireland et al. 2009). This may be

related to the genetic component and to the body condition of the animals from which samples were taken. In the region where these cattle originated from, feeding conditions are usually not adequate. According to Maculan (2013), the average body condition scores of a representative sample of slaughtered cows in the same facility was between 2.00 and 3.00 on a 1 to 5 scale proposed by Wildman et al. (1982). These BCS are lower compared to those reported by studies with cattle in the northern hemisphere, which are usually well conditioned for slaughter (3.00-4.50). These findings may challenge the current concept that microscopic follicles in the follicular reserve are not affected by nutrition. To our knowledge, the effect of long term feed restriction on pre-antral follicle counts has not been well studied yet. The mean number of follicles per 12 fields in various follicle classes was lower than those reported by Cushman et al (2000). Each ovary in the present study had a 2.00 mm² area counted, considering the twelve fields added together. In the study by Cushman et al (2000), the total area considered for each ovary was 10 mm². However, to effectively compare counts between these two experiments, it would be necessary to multiply the values found in this experiment by 10, which would more fairly compare the two results and

their overall conditions. Thus, the mean counts observed in this experiment would not be as discrepant as they seem at first. Those authors, differently from this experiment, worked with cows that have had over 50 years of selection for twinning and were of beef breeds, which may have contributed to the higher counts.

The relative proportions between subclasses reported by Cushman et al (2000), however, were similar to those reported in this experiment, being characterized by a decreasing pattern as follicle develop towards the antral stage. Also, the counting methodology may influence the results and make direct comparisons and subclass estimations more difficult. In the present study, the count patterns, in terms of mean values per class, was fairly repeatable, across equidistant ovarian sections, indicating that the sampling and counting methodology were representing well the actual population.

Results relative to subclasses are interesting, especially in the aspect of the proportion of activated primordial follicles in relation to normal (non-activated) primordials, of 5.9 (0.9) to 0.53(0.09), respectively. This ratio was not reported in the literature, but if interpreted independently, may indicate the possibility that primordial follicles may

be originated possibly by ovarian stromal cells, which is only admitted in mice (Johnson et al. 2004).

The absence of correlations between the observed ovarian measurements and PAFC and other subclasses in this study, does not agree with the findings of Ireland et al. (2011) relative to the antral count. It would be expected that larger ovaries would have PAFC proportionately higher. The established concept that bigger ovaries have higher antral counts was not supported by the present findings. With respect to vulvar measurements, Maculan (2013) only found an association between vulvar width and AFC, when these measures were weighed against animal body weight. In the present experimental conditions it was not possible to analyze body weight, and results were similar to those reported in another trial (Mesquita, 2014), utilizing the same samples, in terms of the absence of associations between genital morphometrics and follicle counts.

The total pre-antral follicle count was positively correlated to the antral count. This finding is in agreement with the literature (Cushman et al, 2000; Ireland, 2008). Although this correlation was positive, the index was very low, such that, only a very small proportion of AFC counts are

explained by the PAFC. Even with the necessary logarithm conversion both count values had a very wide range (0-88), such incidence of low counts was not reported by others (Cushman et al.2000; Ireland, 2008).

Counts between the various follicle classes were associated within each other, with the exception of the primordial class. Positive correlations between primary, secondary and tertiary follicle classes were observed in this study and are similar to those reported by Cushman et al. (1999). Those authors, as in the present study, did not find correlations between the primordial and remaining classes. According to Cushman et al. (1999), the high incidence of atresia in the primordial population could help to explain the drastic reductions in follicle numbers observed in the other classes, thus contributing to the lack of correlation reported.

The proposed atresia index is similar, in concept, to those reported elsewhere in the literature (Monniaux et al. 1984; Santos et al., 2013). Since atresia was solely based on morphological appearance, the chance of errors is far greater in relation to indexes based on modern molecular techniques (Cushman et al., 2001). Curiously, an inverse relationship was observed between ovarian length and atresia index. It is possible to consider that larger ovaries may have better functionality, but

there are no such approaches in the literature for possible comparisons. The same lack of reports is true for the rima vulvae higher atresia in the longer length class found in this experiment. It is interesting that the only associations observed in this trial relate to functional classifications of pre-antral follicle and not to counts solely. Even if not tested critically, the present findings warrant more studies, especially with respect to genitalia morphometrics in relation to the cow body size, so that more objective associations may be traced.

CONCLUSIONS

Tract morphometrics were not directly associated to pre-antral counts. A weak, but significant, association was found between antral and pre-antral follicle populations, which may indicate a real possibility of relating a readily detectable trait with a microscopic fertility trait. The functional classification of pre-antral follicle counts was associated to rima vulvae and ovarian size, indicating possible associations of easily obtainable measurements with follicle developmental capacity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank UFLA, as well as, all the Professors and colleagues that contributed to this study, in special, Nelson Fijamo Mesquita and Geninha. I also wish to thank Dr. Pablo and Frigominas Ltda. for allowing us to obtain the tracts used in this study.

REFERENCES

Binelli, M. , Portela, V.M., Murphy, B.D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl**, v.6, p.134-139, 2009.

Cushman, R. A., Hedgpeth, V. S., Echtenkamp, S. E., Britt ,J.H. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. **Journal Animal Science**, v. 78, p.1564-1567. 2000.

Cushman, R. A.; DeSouza, J. C.; Hedgpeth V. S.; Britt ,J. H. 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**. v. 60, p.349-354, 1999.

Cushman, R. A. DeSouza, J. C.; Hedgpeth, V. S.; Britt, J. H.. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biology of Reproduction**. v.65, 581–586. 2001.

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

Ferreira, M.B.D.**Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactentes da raça Gir (*Bos taurus indicus*).**2011. 176p. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária). UNESP, Jaboticabal, 2011.

Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetza, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L.H., Mossac, F., Lonergan, P. Evans, A. C. O. 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**. v.23, p.1-14. 2011.

Ireland, J. L., D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, A. P. Themmen, F. Ward, P. Lonergan, G. W. Smith, G. I. Perez, A. C. Evans, And J. J. Ireland.. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology Reproduction**, v. 79, p.1219–1225, 2008.

Ireland, J.J., Zielak-Steciwo, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle, **Biology Reproduction**, v.80, p. 954–964, 2009.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., James K. Pru & Jonathan L. Tilly. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

López, S. R., De Souza, J.C., González, J.Z., Sánchez, A.O., Aguirregomezorta, J. R., Carvalho, R.R., Rath, D. Use of sex-sorted and unsorted frozen/thawed sperm and in vitro fertilization events in bovine oocytes derived from ultrasound-guided aspiration;. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.10, p.721-727, 2013.

Maculan, R. **Relação entre morfometria da genitália externa e contagem folicular antral em fêmeas bovinas**. 2013. 43p. (Monografia em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

Monniaux, D., Mariana, J.C., And Gibson, W.R. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 70: 243–253.

Mesquita, N. F. **Dimensões do trato reprodutivo e relação com fertilidade em fêmeas bovinas**. 2014. 35p. (Dissertação em Ciências Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

Moreira, C. F. **Classificação morfométrica e contagem de folículos ovarianos e recuperação embrionária de gatas domésticas (*Felis catus* – linneaus, 1758) suplementadas com taurina**. 2005. 36p. (Dissertação em Ciências Veterinárias) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

Portnoi, M. **Probabilidade, Variáveis Aleatórias, Distribuição de Probabilidades e Geração Aleatória-Conceitos sob a ótica de Avaliação de Desempenho de Sistemas**. Universidade Salvador – UNIFACS 2005

Sales, J.N.S.; Dias L.M.K.; Viveiros A.T.M.; Pereira M.N.; Souza J.C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with: carotene and tocopherol. **Animal of Reproduction Science, Amsterdam**, v.106, n.1/2, p.77-89, June 2008.

SAS - Statistical Analysis System Institute. **SAS/STAT Procedure guide for personal computers**. 334 p., 5. ed. Cary, 1999.

Velazquez, M.A. The role of nutritional supplementation on the outcome of superovulation in cattle **Animal Reproduction Science**, v.126,p.1–10, 2011.

Wildman, E.E.; Jones, G.M.; Wagner, P.E.; Boman, R.L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. **Journal of Dairy Science**.v.65, n 3,p. 495-501, March 1982.

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)