



NELSON FIJAMO MESQUITA

**DIMENSÕES DO TRATO REPRODUTIVO E
RELAÇÃO COM FERTILIDADE EM FÊMEAS
BOVINAS**

LAVRAS – MG

2014

NELSON FIJAMO MESQUITA

**DIMENSÕES DO TRATO REPRODUTIVO E RELAÇÃO COM
FERTILIDADE EM FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Reprodução de Bovinos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

Coorientadores

Dra. Nadja Gomes Alves

Dr. Tarciso de Moraes Gonçalves

LAVRAS-MG

2014

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

Mesquita, Nelson Fijamo.

Dimensões do trato reprodutivo e relação com fertilidade em
fêmeas bovinas / Nelson Fijamo Mesquita. – Lavras : UFLA, 2014.
35 p. : il.

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

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Contagem folicular antral. 2. Complexo cumulus-óocito. 3.
Bovino – Aparelho genital. 4. Raça Tabapuã. 5. Bovino –
Fecundidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.20824

NELSON FIJAMO MESQUITA

**DIMENSÕES DO TRATO REPRODUTIVO E RELAÇÃO COM
FERTILIDADE EM FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Reprodução de Bovinos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de janeiro de 2014.

Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira EPAMIG

Dra. Ana Teresa de Mendonça Viveiros UFLA

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

LAVRAS-MG

2014

Aos meus pais, Micaela (*in memoriam*) e João Mesquita
À Vilma, minha esposa, ao Yemi, meu filho e
Freitas , meu irmão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e nunca me deixar desistir, pelas graças recebidas e por permitir mais essa vitória.

Ao meu irmão, por ser exemplo na minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao meu querido orientador Dr. José Camisão de Sousa, pela disponibilidade sempre que precisei, incentivo e amizade.

Aos Professores Nadja Gomes Alves e Tarciso de Moraes Gonçalves e aos demais Professores do Departamento de Zootecnia, pelos conhecimentos transmitidos durante esta caminhada;

Aos colegas e amigos, pela amizade e convivência que tivemos

Ao Sr. Alderico Campos, por disponibilizar os animais de sua propriedade para a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Animal, pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

O desenvolvimento folicular ovariano e a morfometria são características de fácil acesso para classificar fenotipicamente grupos de vacas. Vacas e novilhas podem ser agrupadas segundo a contagem folicular antral (CFA) e segundo se a sua morfometria externa para predizer sua fertilidade e estabelecer um programa de seleção. Objetivou-se com este estudo relacionar características morfométricas com contagens de folículos antrais (CFA) e complexo cumulus-oócito (CCOs). No experimento I, foi usado o trato genital de 360 fêmeas mestiças Zebu/Holstein. Foi medido o comprimento e a largura da rima vulvar, a cérvix, os cornos uterinos, os ovidutos e os ovários. Foi feita a contagem e aspiração dos folículos antrais e determinado o índice de qualidade ovocitária (1- excelente à 5- degenerado). Foram estabelecidas com base na distribuição de frequência, três classes de tamanho ovariano, rima e largura vulvares. No experimento II, foram feitas as mesmas mensurações com animais *in vivo* de raça Tabapuã (n=80) e a medição do trato genital interno foi realizado através de ultrassonografia transretal. Para análises, as medidas da rima foram divididas pelo peso da vaca para fornecer uma proporção do tamanho relativo do trato genital externa com o tamanho corporal do animal. Para os tamanhos da rima pequeno, médio e grande as médias dos CCO's foram 10.27, 12.55 e 14.85 (P=0.12), e para CFA as médias foram 42.63, 40.18 e 48.03 (P=0.25). Na classe de maior largura vulvar a CFA foi mais alta (3.50, P= 0.0004) do que a pequena (2.57) e média (2.45). Não houve diferenças dos CCO's entre as classes de largura vulvar. A classe de ovários de maior tamanho teve CFA mais alta (P=0.001) do que as classes de ovários menores (33.16, 42.35 e 48.62 para as classes de pequeno, médio e grande tamanho respectivamente). No experimento II, a CFA foi mais alta para classes de tamanho relativo de rima e largura vulvares mais longas (18.96 e 20.08; P=0.035) comparado com de tamanho relativo de rima e largura vulvares mais curtas (14.76 e 11.16; P=0.0001). Em conclusão, as medidas vulvares em proporção ao tamanho corporal, foram bons preditores da reserva folicular ovariana.

Palavras-chave: Contagem folicular antral. Complexo cumulus-oócito. Medições da genitália. Raça Tabapuã, Fertilidade bovina.

GENERAL ABSTRACT

Ovarian follicular development and external morphometry are characteristics of easy access to classify cow groups phenotypically. Cows and heifers may be grouped according to their ovarian antral follicle count (AFC) and external traits in an attempt to predict their fertility and to establish early reproductive culling priority. This study focus on relating morphometric characteristics of the reproductive tract to the AFC and cumulus oophorus oocyte complex (COC) yield. In experiment I, the genital tracts of 360 abattoir Zebu/Holstein crossbred cows were used. Length and width of the rima vulvae, cervix, uterine horns, oviducts and ovaries were measured. Ovarian antral follicles were counted, aspirated and COC counted and classified (1- excellent to 5- degenerate). For statistical analyses, based on frequency distribution, three ovarian size and rima vulvae length and width classes were established. An index of COC quality (CQI) was established which weighed overall gamete quality per individual cow (1-low to 5 high). In experiment II, the same external measurements were performed on live Tabapuã breed cows (n=80) and internal reproductive tract measures were taken by ultrasound. Rima measurements were divided by the cow weight in order to consider a relative to size instead of a direct measure would be considered for analyses. For small, medium and large rima length, respectively, mean number of COCs were 10.27, 12.55 and 14.85 (P=0.12), and AFC were 42.63, 40.18 and 48.03 (P=0.25). Large rima width class CFA was greater (3.50, P= 0.0004) than in the small (2.57) and medium (2.45) classes. COC counts did not differ between rima width classes. Larger ovaries had greater (P=0.001) AFC than smaller ovaries (33.16, 42.35 and 48.62 for the small, medium and large ovarian classes, respectively). In experiment 2, AFC was greater for the longer relative rima length and width (18.96 and 20.08; P=0.035) compared to the shorter relative length and width (14.76 and 11.16; P=0.0001). In conclusion, it was more accurate to predict ovarian reserve when the genitalia measurements were relativized to the size of the animal. This approach proved useful and relatively easy to be applied in the selection of cows with higher antral follicle counts under field conditions in the conditions of the present experiments.

Keywords: Contagem follicular antral. Complexo cumulus-oócito. Medições da genitália. Raça Tabapuã. Fertilidade bovina.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Morfometria do aparelho genital da fêmea bovina	10
2.1.1	Genitália externa (Vulva/vagina)	10
2.1.2	Genitália interna (Cérvix, útero e cornos uterinos, tubas uterinas, ovários)	10
2.2	Foliculogênese	11
2.3	Contagem folicular antral (CFA)	13
	REFERÊNCIAS	16
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	18
	ARTIGO 1 Dimensões do trato reprodutivo e relação com fertilidade em fêmeas bovinas	18

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Estudos relatam que fêmeas *Bos Taurus indicus* têm mais ondas foliculares e mais folículos por onda e maior população de folículos antrais com menor de 5 mm de diâmetro do que fêmeas *Bos taurus taurus*. Além disso, os folículos dominantes e os corpos lúteos são menores e o estro é mais curto em *Bos indicus*, quando comparados com *Bos taurus*. No entanto, nenhuma dessas comparações é tão relevante quanto a produção de ovócitos que podem ser obtidos de fêmeas do *Bos indicus* (Zebu). A média de ovócitos colhidos em vacas Nelore, por sessão de aspiração folicular, varia de 18 a 25, sendo três a quatro vezes superiores à média descrita para fêmeas *Bos taurus*. Em relatos recentes de sessões de aspiração folicular subsequentes, sem estimulação hormonal ou sincronização do crescimento folicular, têm-se colhido, em média, 60 ovócitos de doadoras zebuínas.

O desenvolvimento folicular ovariano é uma característica de fácil acesso para classificar fenotipicamente grupos de vacas. Vacas e novilhas podem ser agrupadas segundo a contagem folicular antral (CFA), em classes alta e baixa. O número de folículos antrais está positivamente associado à fertilidade nas espécies monovulatórias, como os bovinos. Dessa forma, a mensuração do trato genital e o estabelecimento de sua relação com a contagem folicular antral pode ser de grande importância, como método que pode ser usado no desenvolvimento de novos esquemas para seleção de animais de alta fertilidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Morfometria do aparelho genital da fêmea bovina.

Esta abordagem é útil e relativamente fácil de ser aplicada na seleção de vacas com CFA alta nas condições de campo

2.1.1 Genitália externa (Vulva/vagina)

A parte remanescente do tracto genital é dividida entre a vagina e o vestibulo na proporção aproximada de 3:1. Como a vagina é capaz de ampla expansão em comprimento e diâmetro, suas dimensões em repouso não têm grande significado (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Seu comprimento num animal não gravídico é de aproximadamente 25 a 30 cm, mas na vaca gravídica o seu comprimento aumenta. A vulva tem lábios enrugados e espessos, com comissuras agudas; a comissura ventral situa-se a, aproximadamente, 5 cm caudal e ventralmente a mesma distância, ao nível do arco isquiático (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008).

2.1.2 Genitália interna (Cérvix, útero e cornos uterinos, tubas uterinas, ovários)

A maior parte do corpo uterino em bovinos é ocupada por cornos, situados lado a lado no interior de um revestimento seroso e muscular comum. A firmeza da cérvix permite o reconhecimento do limete caudal do corpo uterino, quando se manuseia o órgão intacto, mas não há nada que indique o seu limite cranial. O corpo uterino possui 3 cm, (DYCE; SACK; WENSING, 2010), 3 a 4 cm de comprimento (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008), cada corno uterino mede cerca de 35cm (DYCE; SACK; WENSING, 2010), 35 a 40 cm

(SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008). A cérvix mede de 8 a 10 cm. Ela começa na constrição do óstio uterino interno, além do qual a passagem fica ocluída por projecções interdigitantes provenientes das paredes. Nos animais virgens, elas consistem de três ou quatro pregas circulares, mas tornam-se interrompidas e irregulares nas multíparas (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

As tubas uterinas são longas, (aproximadamente 20-25 cm), seguem um percurso sobre uma bolsa formada pelo desdobramento da borda livre do ligamento largo que envolve o ovário (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008).

Ovários são corpos firmes, irregularmente ovoides e pequenos (4 x 2.5 x 1.5) (SISSON; GROSSMAN; GETTY, 2008; DYCE; SACK; WENSING 2010) em relação ao tamanho corporal e com 15 a 20 g de peso (DYCE; SACK; WENSING, 2010). Estão presos à parede do corpo e ao trato reprodutivo, por meio da inclusão no ligamento largo. Os folículos e os corpos lúteos podem se projetar a partir de qualquer parte da superfície. Os folículos maiores atingem diâmetros de até 2 cm, mas, mesmo aqueles de 8 mm de diâmetro podem ser detectados por palpação retal (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

2.2 Foliculogênese

Em fêmeas mamíferas, a foliculogênese ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para as gônadas em formação, originando as oogônias que se diferenciam em ovócitos, constituindo folículos primordiais (HURK; ZHAO, 2005).

Existem aproximadamente 2×10^6 de células germinativas, no ovário de feto bovino no fim do primeiro terço de gestação, mas esse número diminui drasticamente durante o último período de estágio fetal até ao nascimento (TANAKA et al., 2001), quando a ativação folicular inicia (NOGUEIRA; MARCASSA; BELTRAN, 2005). Os folículos que são recrutados durante a vida

reprodutiva são os que com elas nasceram, (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005) mas essa reserva ovariana é altamente variável (GOUGEON; LEFEVRE, 1983). Após o nascimento, os folículos ovarianos ovulam e entram em atresia. Esses dois processos conduzem a uma redução progressiva no número de ovócitos, ao mesmo tempo em que a reserva de folículos pré-antrais gradualmente se reduz (IRELAND et al., 2009). Assim, a população de folículos préantrais representa a reserva ovariana porque essa constitui mais de 90% de todos os folículos ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2007).

A primeira evidência *in vivo* de que o IGF-I exerce um papel crucial na foliculogênese ovariana e fertilidade feminina vem de IGF-I de camundongos (MONGETA et al., 2002). A população folicular parece não ser afetada no início da fase antral, sugerindo que IGF-I é indispensável no recrutamento de folículos primordiais, bem como para o crescimento de folículos pré-antrais (BAKER et al., 1996).

Na vaca, dois argumentos indiretos desempenham um papel a favor de IGF-I de origem endócrina, na transição de folículos de 2 a 5 mm de diâmetro para a fase de FSH-dependente (> 5 mm de diâmetro). Nessa espécie, o hormônio de crescimento induz ao aumento de IGF-I no soro, no número de folículos em crescimento saudáveis de 2 a 5 mm, sem afetar no número de folículos ovulatórios, nem a concentração de estradiol, progesterona, FSH e LH no soro (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1991). Além disso, deficiência nos receptores de hormônio de crescimento em bovinos da raça Brahma conduz à redução de 30% no peso corporal adulto, sete a oito vezes redução nos níveis de IGF-I, duas a quatro vezes redução no número de folículos, com diâmetro de 2 a 5 mm e redução no número de folículos com diâmetro maior que 5 mm, sem alteração nas concentrações de FSH, LH e estradiol (CHASE JR. et al., 1998). Em bovinos, o IGF-I exerce um papel-chave no acréscimo na sensibilidade de pequenos folículos antrais (5 mm de diâmetro), para a ação das gonadotrofinas e

sua transição para o estágio folicular dependente de gonadotrofinas (MONGETA et al., 2002). A capacidade de regular a transição de folículos primordiais para primários é um pré-requisito na utilização do grande reservatório de folículos primordiais para controlar a fertilidade.

2.3 Contagem folicular antral (CFA)

Folículo ovariano compreende ovócito circundado por células da granulosa. O crescimento ovariano é alcançado quando há um pequeno aumento no volume do ovócito e predominantemente pela proliferação de células da granulosa responsivas a gonadotrofinas e expansão da cavidade antral. Os ovários têm três populações de folículos distintos em diferentes estágios de desenvolvimento: folículos primordiais, folículos em crescimento e folículos antrais (GOUGEON, 1996; KNIGHT; GLISTER, 2006).

O crescimento progressivo de folículo primário para pré-antral pode levar mais de quatro meses e mais dois meses são requeridos para que o folículo antral alcance 2 mm de diâmetro (GOUGEON, 1996).

A praticidade do uso do volume ovariano na predição da capacidade de resposta é limitada devido à manifestação de alterações clínicas significativas na vida reprodutiva (HENDRIKS et al., 2007). A contagem de folículo antral (CFA) é um marcador quantitativo de capacidade de resposta ovariana. À medida que CFA declina progressivamente (perdas anuais 0.35-0.95 de folículos antrais/ano) (NG et al., 2003), torna-se um marcador clinicamente útil da capacidade de resposta ovariana do que volume ovariano.

Em suma, folículos ovarianos com, pelo menos, 2 mm de diâmetro podem ser detectados na ultrassonografia. Folículos com diâmetro que variam de 2 a 5 mm ou 2 a 10 mm se correlacionam bem com o tamanho da reserva de folículos primordiais. Folículos antrais com >2 mm de diâmetro são altamente

responsíveis às gonadotrofinas, mas alguns com esse tamanho podem estar na fase inicial de atresia e, portanto responderem pobremente à estimulação gonadotrófica (GOUGEON; LEFEVRE, 1983).

Durante a fase folicular inicial, folículos antrais saudáveis têm 4 a 6 mm de diâmetro (GOUGEON; LEFEVRE, 1983) e podem melhor representar a proporção, dependente da idade do reservatório visível de folículos antrais (HAADSMA et al., 2007). É possível que, contando somente esses folículos, poderia se evitar incorporação de folículos atrésicos e assim prevenir superestimulação da CFA. Porém, o número de pequenos folículos antrais (2 a 5 mm) está altamente correlacionado com o número de folículos antrais maiores (2 a 10 mm; $r = 0.95$; $P < 0.001$) (BANCSI et al., 2002). Para evitar perda de tempo na tomada de medidas de todos os folículos, recomenda-se a contagem de folículos antrais identificáveis de 2 a 10 mm de diâmetro, método mais prático de avaliação da CFA na prática clínica (BANCSI et al., 2002).

A estimativa de número de folículos presentes no ovário é feita através de estudos histológicos. Assim, o tecido ovariano é submetido a sessões seriadas a uma determinada espessura (μm). As sessões são montadas a intervalos regulares e contados os folículos.

O número de folículos morfológicamente saudáveis nos ovários de bovinos varia entre, aproximadamente, 14000 a 250000. Além disso, o número de folículos primordiais, que compreende a estrutura de diferentes tipos de folículos no ovário, decresce rapidamente com a idade e provavelmente não é repostado.

O número de folículos antrais está positivamente associado às variadas mensurações indiretas de fertilidade nas espécies uniovulatórias, como em bovinos e humanos. Embora essas observações impliquem em um diagnóstico de valor importante por contagem de folículos, esse deve ser interpretado com muita cautela por várias razões; 1) o crescimento dos folículos antrais segue um

padrão de ondas durante o ciclo reprodutivo da vaca (BURN et al., 2005); 2) somente um ponto na quantificação de folículos antrais num estágio desconhecido das ondas foliculares usualmente tem sido usado para avaliar o número de folículos antrais e 3) não é sabido de que forma a variação no número de folículos antrais durante as ondas foliculares é reflexo inerente de alta variação, no número de oócitos morfológicamente saudáveis nas vacas.

REFERÊNCIAS

BAKER, J. et al. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. **Molecular Endocrinology**, v. 10, p. 903–918, 1996.

BANCSI, L. F. et al. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 328–336, 2002.

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.

CHASE JR. C. C. et al. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 212–219, 1998.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 701 p.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and *in vitro* embryo production in large scale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 143–152, 2007.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 941–949, 1991.

GOURGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 121-155, 1996.

GOUGEON, A.; LEFEVRE, B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 497–502, 1983.

HAADSMA, M. L. et al. The number of small antral follicles (2–6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1925–1931, 2007.

HENDRIKS, D. J. et al. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. **Fertility and Sterility**, v. 87, p. 764–775, 2007.

HURK, R. van den; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63 p. 1717–1751, 2005.

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**, v. 80, p. 954–964, 2009.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191–206, 2006.

MONGETA, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 139–154, 2002.

NG, E. H. et al. Effects of age on hormonal and ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. **Human Reproduction**, v. 18, p. 2169–2174, 2003.

NOGUEIRA, G. P.; MARCASSA, G. P. S. D.; BELTRAN, M. P. Variation in the concentration of gonadotropins and follicle population during fetal development in *Bos taurus indicus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005.

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

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 147–160, 2005.

TANAKA, Y. et al. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v. 121, p. 777–782, 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO 1 Dimensões do trato reprodutivo e relação com fertilidade em
fêmeas bovinas**

Artigo formatado segundo as normas da revista *Ciência e Agrotecnologia*

REPRODUCTIVE TRACT MORPHOMETRY AND RELATION WITH FERTILITY IN BOVINE FEMALES

Dimensões do trato reprodutivo e relação com fertilidade em fêmeas bovinas

Nelson Fijamo Mesquita¹, José Camisão de Souza², Renata Maculan³,
Rafaela Rodrigues de Carvalho⁴, Luciana França Smith Maciel⁵, Natália
Alves⁶

ABSTRACT

The aim was to relate morphometric characteristics of the reproductive tract to antral follicle (AFC) and cumulus oophorus complex (COCs) counts. In experiment I, the genital tracts of 360 abattoir Zebu/Holstein crossbred cows were used. Length and width of the rima vulvae and ovaries were measured. An index of COC quality (CQI) was established which weighed overall gamete quality (1-low to 5 high). In experiment II, the same external measurements were performed on live Tabapuã breed cows (n=80) and internal reproductive tract measures were taken by ultrasound. Rima measurements were divided by the cow weight for analyses. For small, medium and large rima length, respectively, COCs were 10.27, 12.55 and 14.85 (P=0.12), and AFC 42.63, 40.18 and 48.03 (P=0.25). Large rima width class CFA was smaller (34.88) than in the small (45.71) and medium (42.25) classes. COCs did not differ between rima width classes. Larger ovaries had greater AFC than smaller ovaries (33.16,

1 Mestrando do Departamento de Zootecnia - Universidade Federal de Lavras nelmesquita@yahoo.com.br

2 Professor - Departamento de Zootecnia Universidade Federal de Lavras

3 Graduando do Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Lavras

4 Graduando do Departamento de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Lavras

5 Graduando do Departamento de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Lavras

6 Graduando do Departamento de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Lavras

42.35 and 48.62 for the small, medium and large ovarian classes, respectively). In experiment 2, AFC was greater for the longer relative rima length and width (18.96 and 20.08; $P=0.035$) compared to the shorter relative length and width (14.76 and 11.16; $P=0.0001$). In conclusion, it was more accurate to predict ovarian reserve when the genitalia measurements were relativized to the size of the animal. This approach proved useful and relatively easy to be applied in the selection of cows with higher antral follicle counts under field conditions.

Index terms: Antral follicle count, cumulus oocyte complex, genitalia measurements, Tabapuã breed, bovine fertility.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo relacionar características morfométricas com contagens de folículos antrais (CFA) e complexo cumulus-oócito (CCOs). No experimento I, foi usado o trato genital de 360 fêmeas mestiças Zebu/Holstein obtidas no matadouro. Foi medido o comprimento e a largura da rima vulvar e os ovários. Foi determinado o índice de qualidade ovocitária (1-baixo à 5- alto). No experimento II, a mesmas medições foram realizadas *in vivo* em fêmeas de raça Tabapuã ($n=80$) e as medição do trato reprodutivo interno foi feita através de ultrassonografia. As medidas da rima foram divididas pelo peso da vaca para análises. Para comprimento de rima pequeno, médio e grande respetivamente, os CCOs foram 10.27, 12.55 e 14.85 ($P=0.12$), e CFA 42.63, 40.18 e 48.03 ($P=0.25$). A classe de rima com maior largura foi inferior (34.88) à pequena (45.71) e a classe média (42.25). Os CCOs não foram diferentes entre as classes de largura da rima vulvar. A classe de tamanho ovariano grande teve CFAs mais altas do que as classes menores (33.16, 42.35 e 48.62 para classes de tamanho ovariano pequeno, médio e grande respetivamente). Em conclusão, foi

mais precisa prever a reserva ovariana quando as medições da genitália foram relativizadas com o tamanho do animal. Esta abordagem mostrou-se útil e relativamente fácil de ser aplicado na seleção de vacas com contagem de folículos antrais alta nas condições de campo.

Termos para indexação: Contagem follicular antral, complexo cumulus-oócito, medições da genitália, Tabapuã breed, Fertilidade bovina.

INTRODUCTION

Bos taurus indicus females have more follicular waves (FIGUEIREDO et al., 1997) and more follicles per wave (CARVALHO et al., 2008) and higher populations of antral follicles less than 5mm in diameter than *Bos taurus taurus* females (SEGERSON et al., 1984). Furthermore, *Bos t. indicus* dominant follicles and corpora lutea are smaller and estrus shorter when compared to *Bos taurus taurus* (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SARTORELLI et al., 2005). However, none of these comparisons are as relevant as the oocyte production Zebu cows are able to yield (SILVA-SANTOS et al., 2011). The average oocyte yield per ovum pick up or OPU session of Nelore cows ranges from 18 to 25, which is three to four folds higher than that of *Bos taurus taurus* (MARTINS JR. et al., 2007). In recent Zebu-OPU reports, oocyte yields have reached up to 60 per OPU session (PONTES et al., 2009).

Ovarian follicular development is a characteristic of easy access for phenotypic classification of groups of cows. Cows and heifers may be grouped according to their AFC (IRELAND et al., 2011; SCHEETZ, 2010). The number of antral follicles is positively associated with fertility in monovulatory species, such as bovines (DEVET et al., 2002; ROOIJ et al., 2002). These overall

assumptions are well established in *Bos taurus taurus* breeds, but need to be studied in Zebu breeds.

The aim of this study was to investigate possible relationships between anatomical characteristics of the reproductive tract and antral follicle and cumulus oocyte complex counts. It is hypothesized that larger external and internal genital measurements indicate higher antral follicle counts.

MATERIAL E METHODS

EXPERIMENT I

The genital tracts of 360 crossbred Zebu/Holstein abattoir cows were collected for the study. Rima vulvae length and width were measured. The lengths and diameters of the cervix, uterine horn and oviduct were also measured, after dissection. The diameters were taken at the midpoint of the cervix and uterine horns and were not recorded for oviducts. Oviduct length was taken from the uterine junction up to the base of the fimbriae. The mean diameter and length of both uterine horns was considered for analysis.

Based on frequency distributions, rima length and width classes were established for analyses as illustrated in figure 1: class I: ≤ 7 cm (n=75); class II: >7 and ≤ 10 cm (n=131) and class III: > 10 cm (n=32) for rima length and class I: ≤ 5 cm (n=75); class II: >5 and ≤ 7.5 cm (n=131) and class III: > 7.5 cm (n=32), where n refer number of animals per class.

Ovarian length, width and height, in mm, were measured with a pachymeter and antral follicle counts were performed with a manual counter and a pen to mark counted follicles, to avoid redundancy. Ovarian size was defined as the multiplication of the three measurements. Ovarian size was classified for analyses as class I: ≤ 7 mm³ (n=65 and 58); class II: >7 and ≤ 11 mm³ (n=73 and 57) and class III : > 11 mm³ (n=88 and 122) for the left and the right ovaries,

respectively. The sum of the right and left ovary sizes was defined as total ovarian size and classified for analyses as follows: Class I: $\leq 15 \text{ mm}^3$ (n=59); class II: >15 and $\leq 25 \text{ mm}^3$ (n=101) and class III: $> 25\text{mm}^3$ (n=78).

Follicles were aspirated and isolated according to techniques described elsewhere (LEIVAS et al., 2004, BOLS et al., 1995). Cumulus oocyte complexes (COC) were classified from I- excellent to V- degenerate (GONÇALVES et al., 2002).

An index for cumulus oocyte complex quality (CQI), adapted from previous literature (SALES et al., 2008) was determined for each animal, by the addition of the multiplication of the COC number within each grade by a descending number (from 5 to 1) divided by the total number of COCs for each cow, such that, $CQI = (\text{COCs grade I} * 5 + \text{COCs grade II} * 4 + \text{COCs grade III} * 3 + \text{COCs grade VI} * 2 + \text{COCs grade V} * 1) / \text{Total COCs}$.

A mean score (three observers) for pelvic fat (around ligaments and genital structures) of 65 cows were used for analyses, such that, 1- lean, denoting absence of fat; 2- intermediate, denoting some fat and 3- obese, denoting large widespread fat deposits.

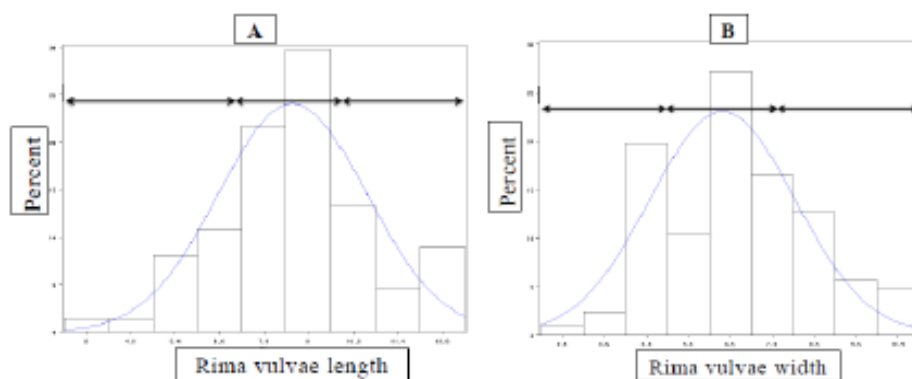


Figure 1. Rima vulvae length and width frequency distributions

EXPERIMENT II

The rima vulvae of Zebu breed Tabapuã cows (n=55) aging from 3 to 8 years were measured similarly as in experiment I, except for the internal genitalia, which was measured by a 5.0 MHz linear transrectal probe and an Aloka 500 ultrasound unit in B-mode. Images were recorded (Play TV USB 2.0-Prolink Computer, 2000) and measurements and counts performed afterwards by two observers and the mean used for analysis. Additionally, live weight and hip height were recorded.

Rima length and width were divided by the weight for analyses in order to weigh the size of the rima relative to the size of the cow. This was termed relative rima length or width.

All statistical procedures were performed by the SAS[®] statistical program (SAS, Cary, NC, USA) Data were tested for normality by the PROCUNIVARIATE procedure and necessary conversions were performed when variables were non-normally distributed. Additional regression analysis was performed between rima length/width and antral follicle counts in the experiment II. Continuous data, antral follicle counts and CQI were also analyzed and compared between classes of ovarian size and pelvic fat by the PROCGLM procedure and means were compared by the Tukey test considering a 5% probability for significance.

RESULTS AND DISCUSSION

EXPERIMENT I

The lengths and diameters of the cervix, uterine horn and oviduct did not influence antral follicle count (AFC). AFC and total COCs were similar between the rima vulvae length classes and were similar between rima width classes WI and WII and greater ($P < 0.05$) than class WIII (Table 1).

Table 1. Rima vulvae length and width, antral follicle count and total cumulus oocyte complexes in abattoir derived bovine genital tracts. Numbers are least square mean and standard error of the means.

Rima vulvae length class ¹	AFC		COC	
	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
I	75	42.63 \pm 2.85	73	10.27 \pm 1.13
II	131	40.18 \pm 2.15	127	12.55 \pm 0.85
III	32	48.03 \pm 4.23	32	14.85 \pm 1.68
Rima vulvae width class ²				
I	75	45.71 ^a \pm 2.57	73	12.41 \pm 1.02
II	131	42.25 ^a \pm 2.45	127	13.09 \pm 0.98
III	32	34.88 ^b \pm 3.50	32	9.80 \pm 1.40

Means followed by superscripts within the column indicate difference ($P < 0.005$, Tukey test).

N: number of females

\bar{X} : mean

SEM: standard error of the mean

AFC: antral follicle count

COC: cumulus oocyte complex totals

¹ class LI: ≤ 7 cm; class LII: >7 and ≤ 10 cm and class LIII: > 10 cm

² class WI: ≤ 5 cm; class WII: >5 and ≤ 7.5 cm and class WIII: > 7.5 cm

The ovarian reserve of antral follicles, counted directly on the abattoir ovaries, was not associated with the rima vulvae length classes. In the literature accessed until the present moment, no report related to this association has been found. It is possible, however, to relate similar antral follicle counts in cows of the Nelore Zebu breed (RODRIGUES et al., 2013; BARUSELLI et al., 2012).

The Tabapuã cattle has the Nelore breed as one of its main components therefore, such similarity in the AFC is expected.

Similarly to the AFC, the amount of cumulus oocyte complexes found were not associated to the rima length classes. Total COC averages in the present trial are smaller than those reported in Zebu cows by Pontes et al. (2009) and Martins Jr. et al. (2007). The number of oocytes was always lower than the AFC, which may reflect losses due to aspiration techniques and methodology, although this is commonly found in the literature (MERETON et al., 2012; BARROS; NOGUEIRA, 2001). The same is true in relation to embryo recovery and corpora lutea (CL) counts in embryo transfer reports (IRELAND et al.; 2007; BARUSELLI et al., 2006). Moreover, the present COC recovered are higher than those reported in *Bos taurus taurus* (IRELAND et al., 2011), as well, as a wider range (up to 120 oocytes, PONTES et al., 2009). Finally, it can be concluded that, similarly to the AFC, total COC was not related to the rima vulvae length class. Also, comparisons with other results are quite difficult due to the unique approach of the present experiment.

In respect to the rima width, the only difference found was the smaller AFC in the larger vulva width class and no relation to total COC counts could be detected. In fact, this finding was unexpected, according to our proposed hypothesis. No such results and comparisons were found in the literature for discussion. Perhaps, as we will be able to confirm later in this paper, external genitalia measurements taken without considering other external traits related to body size, may not be sufficient to define them correctly.

Antral follicle counts were similar between all size classes of the left ovary. In the right ovary, AFC was similar between classes II and III, which were larger than class I. Antral follicle counts were similar between ovarian total size classes II and III, which were greater than class I (Table 2).

Table 2. Ovarian size and antral follicle count in abattoir bovine ovaries (left, right and total ovarian size)

Ovarian size class (mm ³) ¹	Left ovary AFC		Righth ovary AFC		Left + Right AFC	
	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
I	65	17.46 \pm 1.50	58	17.18 ^a \pm 1.76	59	33.16 ^a \pm 3.24
II	73	22.73 \pm 1.42	57	21.35 ^b \pm 1.81	101	42.35 ^b \pm 3.55
III	88	23.00 \pm 1.29	122	24.90 ^b \pm 1.24	78	48.62 ^b \pm 3.73

Means followed by superscripts within the column indicate difference ($P < 0.005$, Tukey test).

N: number of ovaries

\bar{X} : mean

AFC: antral follicle count

SEM: standard error of the mean

¹ class I: $\leq 15 \text{ mm}^3$; class II: >15 and $\leq 25 \text{ mm}^3$ and class III: $> 25 \text{ mm}^3$

This may reflect possible functional characteristics of the right ovary (GERES et al., 2011; LOPEZ-GATIUS, 1997) or the fact that a larger proportion of class RIII was observed in the right ovary increasing the statistical power to detect the difference. Similarly to the general ovarian size classes, there was a pattern, at least in the right ovary, for greater AFC and increasing size.

The finding that largest ovaries yielded more follicles was expected and similar to results in *Bos taurus taurus* (IRELAND et al., 2011; CUSHMAN et al., 2009). Although it could not be related to a cow actual size, a more direct and the linear pattern of increasing size associated with larger AFC was noted, compared to rima vulvae.

Cumulus oocyte complex quality index or CQI was greater for pelvic fat score 2 compared to the scores 1 and 3. Total ovarian size class II had greater CQI than classes I and III (Table 3).

Table 3. Cumulus oocyte complex quality index, pelvic fat score and ovarian size in abattoir bovine genital tracts

Score/Class	Pelvic fat CQI		Total ovary size CQI	
	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
I	20	2.99 ^b \pm 0.08	21	2.96 ^b \pm 0.08
II	36	3.22 ^a \pm 0.06	25	3.19 ^a \pm 0.08
III	9	2.90 ^b \pm 0.12	19	2.95 ^b \pm 0.09

Means followed by superscripts within the column indicate difference ($P < 0.005$, Tukey test).

N: number of observations

\bar{X} : mean

SEM: standard error of the mean

CQI: cumulus oocyte complex quality index

Score I- lean; score II- intermediate and score III- fat.

Class I: $\leq 15 \text{ mm}^3$; class II: >15 and $\leq 25 \text{ mm}^3$ and class III: $> 25 \text{ mm}^3$

As far as cumulus complex quality was concerned, the results indicated a pattern, such that intermediate size classes or fat scores were associated with better quality. These results corroborate a series of publications and express a direct link between excessive fat and likely low fertility in cows. High body fat deposition has been associated with low oocyte quality by Santos, Cerri and Sartori (2008); De Haas, Janss e Kadarmideen (2007); Adamiak et al. (2004; 2005) and Lucy (2003). This indicates that the nutritional and metabolic status may interfere with the growth patterns of ovarian follicles, hormonal synthesis which impact on oocyte quality.

The present results also indicate that the proposed index for COC quality may be a more refined predictor of the metabolic status of cows in comparison to the stratified (by oocyte grade classes) method, usually found in the literature.

On the other hand, Mossa et al. (2012) and Ireland et al. (2008; 2009; 2011) showed that cows with low AFC have smaller ovaries and reduced numbers of follicles and morphologically sound oocytes. Additionally, those cows have reduced superovulation responses, low transferable embryo yield, chronically elevated gonadotropins secretion with low circulating AMH and progesterone during their estrous cycles. The cows also showed reduced endometrial width which is associated with low fertility.

EXPERIMENT II

For measurements taken on live animals, there was a low correlation ($r^2=0.0568$) between rima length and width, however, a moderate correlation ($r^2=0.36$) was observed between hip height and body weight.

This indicates that the index of proportional genitalia size may be related to either height or body weight, however, a decision should be made in terms of using either rima length or width. Perhaps vulvar total area may be a better indicator of size, although more difficult to obtain under field conditions that demand a fast pace at the chute.

Antral follicle count was higher for the higher rima vulvae length and width relative indexes (Table 4).

Table 4. Antral follicle count, rima vulvae length and width relative indexes in the Tabapuã Zebu breed cows. Numbers are least square means (lsmeans).

Rima vulvae length/body weight index class¹	N	AFC	SEM	CV	P
LowL	29	14.76 ^b	1.51	21.6	0.0353
HighL	19	18.96 ^a	1.87		
Rima vulvae width/body weight index class²					
LowW	20	11.16 ^b	1.60	18.58	0.0001
HighW	28	20.08 ^a	1.36		

Means followed by superscripts within the column indicate difference ($P < 0.005$, Tukey test).

N: number of cows

CFA: antral follicle count

SEM: standard error of the mean

CV: coefficient of variation

P: probability

¹ LowL: ≤ 1.90 and HighL: > 1.90

² LowW: ≤ 1.30 and HighW: > 1.30

Through these data it can be verified that the elaboration of indexes that convey more precisely cow size relationships is necessary in order to make better predictions related to fertility traits. It is clear that when relative size indexes were used the external genitalia morphometry was easily associated with antral follicle counts and probably reflect fertility. These data incorporate originally to the ovarian size/AFC findings (IRELAND et al., 2011), the concept that external genitalia measurements are also associated to the AFC, as long as, their relation to cow size is considered.

Vulva width was more strongly associated with AFC than length, although its measurement, according to the method used in this experiment, is dependent of the rima mid point, which was used to determine the width. Unfortunately, in some cows the external limits of the vulva are not easily identified, adding a minor limitation to the uniformity of this method. Rima

length would be the ideal method because it is repeatable and unequivocal. Independently of these arguments, within our data limits, vulva width seemed to be a better predictor of AFC than length.

CONCLUSION

External genitalia measurements in abattoir reproductive tracts which did not take into account the size of the cow are not appropriate to predict ovarian follicular reserve. In Tabapuã cows examined on the farm, vulva measurements relative to body size were good predictors of the ovarian follicular reserve, especially vulva width. Additional studies to further verify the possible associations of the external reproductive tract morphology with antral follicle counts, as well as, studies to improve our proposed methodology in Zebu cows are warranted.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the National Research Council of Brazil (CNPq) for the scholarship, to the GERE members without whose help this study would not have been possible.

REFERENCES

- ADAMIAK, S. J. et al. Dietary carbohydrates and lipids affect in vitro embryo production following OPU in heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 193–194, 2004.
- ADAMIAK, S. J. et al. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 918–926, 2005.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1463-1496, 2001.
- BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, Suppl. 4, p. 134–141, 2012.
- BARUSELLI, S. P. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77–88, 2006.
- BOLS, P. E. J. et al. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cows: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-687, 1995.
- CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus x Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167–175, 2008.
- CUSHMAN, R. A. et al. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cow: Investigation of influence of stage of estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1971-1980, 2009.
- DE HAAS, Y.; JANSS, L. L.; KADARMIDEEN, H. N. Genetic correlations between body condition scores and fertility in dairy cattle using bivariate random regression models. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, p. 277-285, 2007.
- DEVET, A. et al. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertility and Sterility**, v. 7, p. 357–362, 2002.

FIGUEIREDO, R. A. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489–1505, 1997.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and *in vitro* embryo production in large scale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 143–152, 2007.

GERES, D. et al. Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs in dairy cows. **Veterinary Archives**, v. 81, p. 187-198, 2011.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

IRELAND, J. J. et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 1-14, 2011.

IRELAND, J. J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1687–1695, 2007.

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**, v. 80, p. 954–964, 2009.

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.

LEIVAS, F. G. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 219-224, jan./fev. 2004.

LOPEZ-GATIUS, F. Transuterine sperm transport is not affected by bilateral asymmetry of the reproductive system in dairy cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 1319-1325, 1997.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 61, p. 415–417, 2003.

MARTINS JR. A. et al. Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize *in vitro* bovine embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 p. 1194, 2007. (Abstract).

MERETON, J. S. et al. Bovine OPU-derived oocytes can be matured in vitro for 16–28 h with similar developmental capacity. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 47, p1037–1042, 2012.

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

PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690–697, 2009.

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

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

ROOIJ, I. A. van. et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction**, v. 17, p. 3065–3071, 2002.

SALES, J. N. S. et al. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocoferol. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 77–89, 2008

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, p. 88–97, 2008.

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382–2394, 2005.

SCHEETZ, D. M. **Regulation and role of anti-Mullerian hormone in bovine reproduction**. 2010. 139 p. Dissertation (Master of Science in Reproduction) - Michigan St University, East Lansing, 2010.

SEGERSON, E. C. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1026–1046, 1984.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, p. 1051–1057, 2011.