

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO COMO MARCADOR
BIOLÓGICO DE PRECOCIDADE SEXUAL E EFICIÊNCIA
REPRODUTIVA EM BOVINOS NELORE**

LUIZ CARLOS CESAR DA COSTA FILHO

CAMPO GRANDE, MS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO COMO MARCADOR
BIOLÓGICO DE PRECOCIDADE SEXUAL E EFICIÊNCIA
REPRODUTIVA EM BOVINOS NELORE**

*Anti-Müllerian hormone as a biological marker of sexual precocity and reproductive efficiency
in Nelore bovine*

Luiz Carlos Cesar da Costa Filho

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal

CAMPO GRANDE, MS

2017

Certificado de aprovação

LUIZ CARLOS CESAR DA COSTA FILHO

**HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE PRECOCIDADE SEXUAL E
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS NELORE**

**Anti-Müllerian hormone as a biological marker of sexual precocity and
reproductive efficiency in Nelore bovine**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado(a) em: 24-02-2017

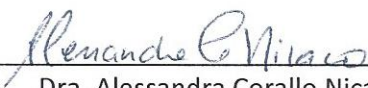
BANCA EXAMINADORA:



Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva
(UFMS) – (Presidente)



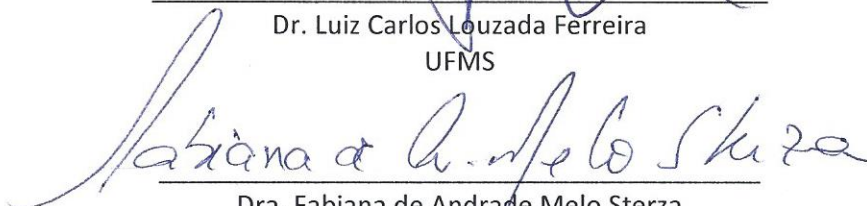
Dra. Juliana Corrêa Borges Silva
EMBRAPA



Dra. Alessandra Corallo Nicacio
EMBRAPA



Dr. Luiz Carlos Louzada Ferreira
UFMS



Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza
UEMS

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Por ser minha fonte inesgotável de fé e sabedoria, por me dar força, coragem e tranquilidade para crescer como ser humano. Obrigado, pois mesmo sendo um filho ainda cheio de imperfeições, jamais abandonou meu caminhar.

À minha família...

Aos meus pais, Luiz Carlos e Christiane, pelo apoio incondicional em cada momento de minha vida, me levantando e me cuidando sempre que necessário, pelo incentivo para que eu possa alçar meus vãos o mais longe que consiga chegar. Amo vocês.

À minha irmã e família, Tatiana e Rodrigo, aos meus sobrinhos e afilhados, Felipe e Thiago, pelo amor e carinho incondicionais. Amo vocês.

A meus amigos...

Aos meus grandes amigos da vida, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e incentivando. Não citarei nomes para não esquecer de nenhum de vocês.

À minha orientadora Professora Lili, pelo apoio, amizade, incentivo e aprendizado.

À Professora Inês, por todos os ensinamentos, amizade e colaboração.

Aos grandes amigos que fiz durante a pós graduação, Lorena, Vanessa, Vitor, Cynthia, Ellen (Elinha Cristina), Fernanda (Fernanda Regina), Tallita (Talita Maria), Eduardo (Eduardo Maciel), Alini, Gabi Jacques, Carol, que me aguentaram, ajudaram e sempre me apoiaram em todos os meus passos no doutorado.

Aos técnicos de laboratório, Luizão e Ludomir, pela ajuda e ensinamentos.

Ao Edgar, pelo auxílio e disposição em ajudar sempre.

À Genética Aditiva, Embriza Biotecnologia Ltda e Fazenda Arizona pelo apoio a pesquisa.

À equipe da Geonatuz por me ceder local para trabalhar e a amizade.

À Fundect-MS pela bolsa de doutorado e apoio financeiro ao projeto.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

"Fique contente em agir. Deixe a fala para os outros."
Baltasar Gracian

"Em matéria de felicidade só se possui aquela que se dá"
Emmanuel

"...Quando os meus olhos não podiam ver Tua mão segura me ajudou a andar..."
Pe. Fábio de Melo

*"...A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim
Por isso prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe
Pra perto de mim..."*
Ana Vilela

Resumo

COSTA FILHO, L. C. C. Hormônio anti-Mülleriano como marcador biológico de precocidade sexual e eficiência reprodutiva em bovinos Nelore. 2017. 95 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

O objetivo desta tese é mostrar a fundamentação teórica e prática do hormônio anti-Mülleriano (AMH) como marcador biológico de precocidade sexual e eficiência reprodutiva em bovinos Nelore, haja visto que a pecuária nacional necessita de mudanças no que tange a sua produtividade, diminuindo custos, acelerando a produção e melhorando a eficiência da sua cadeia produtiva. O desempenho reprodutivo é a característica econômica mais importante num rebanho. Reduzir a idade à puberdade dos bovinos trará muitos benefícios, como aumento na vida reprodutiva e maior produção de bezerros, beneficiando toda a bovinocultura. Em ambos os sexos, a idade à puberdade, característica indicadora de precocidade sexual dos animais, deve ser foco dos programas de seleção, principalmente de raças zebuínas. A dosagem do AMH constitui uma forma útil na detecção de puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e puberdade tardia (altas concentrações de AMH) em humanos. Outro papel importante do AMH é como marcador preditivo da resposta ovariana para pacientes submetidos à fertilização *in vitro*, refletindo a reserva ovariana. O ritmo de secreção do AMH em fêmeas e machos bovinos não está estabelecido e o conhecimento desse padrão é de suma importância, para que parâmetros clínicos de comparação de momento de dosagem sejam estabelecidos. Os fatores da relação do AMH com precocidade sexual de bovinos, como marcador da reserva ovariana e o seu ritmo de secreção foram estudados e suas respostas descritas. Os resultados encontrados no primeiro experimento mostram que o AMH, em bovinos Nelore, não apresenta um ritmo circadiano, tendo um ritmo de secreção com baixa frequência e baixa amplitude. No segundo experimento não foi encontrada correlação da concentração do AMH com nenhuma das características estudadas. No terceiro experimento não foi possível identificar correlação entre a classe de precocidade do pai em relação aos bezerros. Nas condições do experimento, o AMH não pode ser considerado um potencial marcador endócrino de seleção de doadoras para PIV nas raças Nelore e Gir, pois o hormônio não se correlacionou à nenhuma das características estudadas.

Palavras-chave: PIVE. Reprodução Animal. Secreção hormonal.

Abstract

The objective of this thesis is to show the theoretical and practical foundation of the anti-Müllerian hormone (AMH) as a biological marker of sexual precocity and reproductive efficiency in Nelore cattle, given the fact that the national livestock needs changes in terms of productivity, reducing costs, accelerating production and improving the efficiency of its production chain. Reproductive performance is the most important economic characteristic in a herd. Reducing the age of bovine puberty will bring many benefits, such as an increase in the reproductive life and greater production of calves, benefiting all bovine animals. In both sexes, the age at puberty, an indicative characteristic of sexual precocity of animals should be the focus of selection programs, mainly of Zebu breeds. The dosage of AMH is a useful way to detect early puberty (low concentration of AMH) and late puberty (high concentration of AMH) in humans. Another important role of AMH is as a predictive marker of ovarian response for patients undergoing in vitro fertilization, reflecting the ovarian reserve. The standard curve or biological rhythm of males and females bovine is not established and the pattern of this knowledge is of the utmost importance, for which clinical parameters of comparison of AMH dosing moment are established. The factors of the relationship of AMH with bovine sexual precocity, as a marker of the ovarian reserve and its biological rhythm were studied, and their responses have been described. The results found in the first experiment show that AMH, in Nelore cattle, does not present a circadian rhythm, having a rate of secretion with low frequency and low amplitude. In the second experiment no correlation of the HMA concentration was found with any of the characteristics studied. In the third experiment it was not possible to identify a correlation between the parent's precocity class in relation to the calves. Under the conditions of the experiment, AMH can not be considered as a potential endocrine marker of donor selection for IVP in the Nelore and Gir races, since the hormone did not correlate with any of the characteristics studied.

Keywords: Animal Reproduction. Hormonal secretion. IVEP

Lista de tabelas

Ritmo de secreção do hormônio Anti-Mülleriano (AMH) de macho e fêmea Nelore.

Tabela 1. Médias e desvio padrão da Idade (meses), peso (kg) e medidas dos folículos nos ovários direito e esquerdo (mm) de 6 novilhas Nelore nos diferentes momentos de coleta (1 a 4).....	60
Tabela 2. Médias e desvio-padrão dos aspectos clínicos reprodutivos e desempenho de 6 machos Nelore de acordo com o momento de coleta (1 a 4).....	60
Tabela 3. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de 6 touros jovens Nelore nos diferentes momentos de coleta (1 a 4).....	61

Avaliação comparativa do hormônio Anti-Mülleriano à desmama da progênie masculina Nelore de acordo com a precocidade sexual paterna.

Tabela 1. Correlações entre características físicas e reprodutivas com a classe de precocidade sexual do animal (PrecBez) e do pai (PrecPai).....	74
Tabela 2. Médias ($\pm$ desvio padrão) dos aspectos clínicos andrológicos e níveis séricos de hormônio anti-Mülleriano (AMH) e de testosterona (T) de acordo com a classe de precocidade sexual à desmama e à puberdade de bezerros Nelore.....	75
Tabela 3. Médias ($\pm$ desvio padrão) dos aspectos clínicos andrológicos e níveis séricos de hormônio anti-mülleriano (AMH) e de testosterona (T) de acordo com a classe de precocidade sexual dos Pais de bezerros Nelore à desama e à puberdade.....	76

Hormônio anti-Mulleriano (AMH) como preditor da produção de embriões *in vitro* de vacas *Bos indicus*.

Tabela 1. Comparação da idade, dosagem do AMH, contagem folicular, produção ovocitária e embrionária de doadoras Nelore e Gir e valores médios das duas raças.....	86
Tabela 2. Comparação idade, dosagem do AMH, contagem folicular, produção ovocitária das duas classes de produção de embrião, Classe 1 (0 a 5) e Classe 2 (>5).....	87
Tabela 3. Comparação da dosagem do AMH, contagem folicular, produção ovocitária e embrionária de acordo com a idade de doadoras de ovócito de diferentes idades.....	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Precocidade Sexual.....	13
2.2 Puberdade.....	14
2.2.1 Puberdade nos machos.....	15
2.2.2 Puberdade nas fêmeas.....	17
2.3 Hormônio AMH.....	19
2.3.1 AMH em machos.....	21
2.3.2 AMH em fêmeas.....	24
2.3.2.1 Ação do AMH na formação de folículos primários.....	24
2.3.2.2 Ação do AMH na ativação de folículos primários.....	25
2.3.2.3 AMH no crescimento folicular.....	26
2.3.2.4 AMH como marcador da reserva ovariana.....	28
2.3.2.5 AMH na produção de embriões <i>in vitro</i> (PIV).....	30
2.4 Cronobiologia.....	31
3 REFERÊNCIAS.....	37
Ritmo de secreção do hormônio Anti-Mülleriano (AMH) de macho e fêmea Nelore.....	56
Resumo.....	56
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Materiais e Métodos.....	58
Resultados.....	60
Discussão.....	63
Referências.....	65
Avaliação comparativa do hormônio Anti-Mülleriano à desmama da progênie masculina Nelore de acordo com a precocidade sexual paterna	68
Resumo.....	68
Abstract.....	68
Introdução.....	69
Materiais e Métodos.....	70
Resultados.....	72
Discussão.....	76
Referências.....	79
Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como preditor da produção de embriões <i>in vitro</i> de vacas <i>Bos indicus</i>.....	82
Resumo.....	82
Abstract.....	82
Introdução.....	83
Materiais e Métodos.....	84
Resultados.....	86
Discussão.....	87
Referências.....	91

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil assumiu papel importante na exportação de carne bovina. A base de criação do rebanho nacional é de animais criados a pasto, tendo como maior grupo genético o *Bos indicus*, o que possibilita menor custo de produção quando essas duas características são unidas em um único sistema. A produção nacional é realizada na sua maior parte de forma extensiva, e seus índices zootécnicos de produção são muito baixos comparados a outros países. Com isso faz-se necessário que os produtores brasileiros adotem novas tecnologias de produção incorporando vantagens com aumento na produtividade, consequentemente possibilitando a exploração do ganho com a venda dos animais em escala, aumentando o capital de giro da propriedade e melhorando a receita a longo prazo (Cervieri, 2012).

Se o país pretende continuar na liderança mundial da produção de carne bovina, precisa ter como principais metas, melhorar o potencial genético do gado zebu, principalmente, no que diz respeito a sua precocidade sexual, e ainda melhorar o desempenho do rebanho de uma forma geral na época da seca (Franco & Brumatti, 2007).

A pecuária sofre com desempenhos limitados na sua grande extensão, e as falhas na reprodução constituem um dos fatores mais importantes para esse comportamento (Silva, 2005). Baixas taxas de desfrute, resultantes da reduzida taxa de gestação e elevada idade ao primeiro parto, na média nacional, dificultam os avanços na produção de proteína de origem bovina. Nos países que servem-se das técnicas de manejo seletivo há mais tempo que o Brasil, as fêmeas, tanto de corte como de leite e na maioria das vezes *Bos taurus*, têm o primeiro parto aos dois anos de idade (Wolfe et al., 1990).

Os custos de manutenção da propriedade pecuária necessitam ser reduzidos, e uma das formas mais rápidas de conseguir tal resultado é diminuir o ciclo de produção dos animais (Marcondes et al., 2000)

Para que o ciclo de produção seja o menor possível, os critérios para características reprodutivas devem ser incluídos na seleção de bovinos de corte; no entanto, isto não tem ocorrido de forma muito rápida, como o que acontece com as características de desenvolvimento ponderal (Pereira et al., 2001).

A literatura começa a demonstrar que seleção de fêmeas que parem após serem expostas a uma estação de monta, em contrapartida ao descarte das que não parem, possui herdabilidade de moderada a alta (Silva et al., 2003a; Silva et al., 2005).

Desempenho reprodutivo é a característica econômica mais importante em um rebanho. Melhorar o fator genético, propondo-se reduzir a idade a puberdade, contribui com o aumento na vida reprodutiva dos animais e, como consequência, maior produção do número de bezerros, beneficiando toda a cadeia produtiva (Cardoso & Nogueira, 2007). Programas de seleção de novilhas de reposição concentram-se em conhecer os processos fisiológicos que determinam o início da puberdade (Patterson et al., 2006).

Sendo a reprodução um processo complexo, selecionar diretamente características ligadas a ela é, em muitos momentos, de difícil aplicabilidade, necessitando-se conhecer e identificar aspectos reprodutivos facilmente mensuráveis, como variabilidade genética e geneticamente correlacionados com os eventos da reprodução. Em ambos os sexos, idade à puberdade, característica indicadora de precocidade sexual dos animais, deve ser foco dos programas de seleção (Bergmann, 1999).

A dosagem do nível do hormônio Anti-Mülleriano (AMH) constitui uma forma útil na detecção de puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e puberdade tardia (altas concentrações de AMH) em humanos (Rey et al., 1993; Okay, 2003). Porém, em bovinos, poucos trabalhos utilizando o AMH como marcador biológico de puberdade são encontrados, e até mesmo seu ritmo de secreção em bovinos não se encontra discutido na literatura.

O uso das biotecnologias da reprodução têm contribuído para a melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho, é a utilização de biotecnologias da reprodução como *ovum-pick-up* (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIV), podendo aumentar rapidamente o ganho genético, tanto nas linhagens paternas, como na linhagem materna. Porém, essa tecnologia é dependente de características individuais dos animais expostos a tal. A população folicular apresenta grande variabilidade entre as doadoras, mesmo tendo alta repetibilidade no mesmo indivíduo (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007).

Níveis séricos de AMH podem ter valor significativo na prática, pois são um marcador preditivo da resposta ovariana para mulheres submetidas a fertilização *in vitro*, refletindo a reserva ovariana (Beckers et al., 2002).

Com essas informações relevantes o objetivo deste trabalho é mostrar a fundamentação teórica e prática do AMH como marcador biológico de precocidade sexual e eficiência reprodutiva em bovinos Nelore.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Precocidade Sexual

A seleção para elevada precocidade sexual e fertilidade em bovinos, aumenta a disponibilidade de animais, tanto para comercialização, quanto para seleção, permitindo maior intensidade seletiva e, conseqüentemente, progressos genéticos mais elevados e lucrativos (Bergmann, 1999).

Para a expressão do seu potencial genotípico, ressalta-se que os animais em qualquer fase da sua vida (nascimento, pré-puberal, puberdade e maturidade sexual), devem ser criados de forma a suprirem suas necessidades fisiológicas para crescimento e manutenção (Guimarães et al., 2011).

Nos rebanhos bovinos que selecionam animais baseando-se na primeira parição aos 24 meses, a taxa de desfrute pode chegar a 40%. Com estes dados fica claro que a decisão de trabalhar com a precocidade sexual terá reflexo direto na eficiência, rentabilidade e comprometimento da empresa rural (Fries & Albuquerque, 1999).

Nenhuma outra característica apresenta tantas possibilidades e alternativas para ser alterada como a precocidade sexual e, ao mesmo tempo, nenhuma apresenta tal potencial e capacidade de impacto econômico sobre o sistema produtivo (Fries, 2007).

A pecuária nacional tem a sua disposição vários sumários publicados com DEP's (Diferença esperada na progênie) para algumas características associadas à precocidade sexual, como perímetro escrotal (PE), idade ao primeiro parto (IPP) e probabilidade de prenhez precoce (3P ou PPP) (Albuquerque & Baldi, 2010).

A medida de PE, normalmente feita aos 365 dias, é utilizada como indicadora de precocidade. Apresenta vantagem de ser facilmente mensurável em grandes populações, com estimativas de herdabilidade de moderada a alta, variando de 0,30 a 0,70 (Lobo et al., 1995; Pereira et al., 2000; Dias et al., 2003; Yooko et al., 2007).

A IPP possui herdabilidade de magnitude baixa a moderada, variando de 0,01 a 0,46 (Pereira et al., 1991; Gressler et al., 1998; Mercadante et al., 2000; Dias et al., 2004). A baixa herdabilidade encontrada para essa característica, indica que a resposta à seleção deve ser lenta, pois existe influência do manejo reprodutivo adotado na fazenda. Além disso, muitos selecionadores ainda utilizam a idade e o peso como critério para o início da vida reprodutiva das fêmeas, de tal maneira, que

não é possível identificar as novilhas mais precoces, perdendo-se parte da variabilidade genética (Albuquerque & Baldi, 2010).

A característica PPP pode responder rapidamente à seleção em virtude das altas estimativas de herdabilidade, variáveis de 0,50 a 0,73 para novilhas expostas à estação de monta (EM) pela primeira vez entre 14 e 18 meses de idade (Eler et al., 2002; Silva et al., 2003b; Eler et al., 2004; Silva et al., 2005; Shiotsuki et al., 2009).

Um dos grandes questionamentos existentes sobre a seleção para precocidade sexual em bovinos, é sobre a vida reprodutiva futura das matrizes expostas precocemente à EM, apresentando o primeiro parto entre 22 e 27 meses. Trabalhos evidenciam as comparações do desempenho de vacas sexualmente precoces, expostas aos touros pela primeira vez aos 15-16 meses, e não precoces, expostas aos 24 meses de idade. Os resultados mostram não haver diferença entre os dois grupos estudados no que diz respeito ao peso médio de seus bezerros após o primeiro parto, no tempo de permanência no rebanho e nem no peso adulto das fêmeas (Terakado et al., 2008; Terakado et al., 2009ab).

Para iniciar uma seleção para precocidade sexual em bovinos é necessário identificar o momento da entrada na puberdade dos animais, e conhecer a fisiologia de desenvolvimento dessa fase da vida faz-se indispensável.

2.2 Puberdade

A puberdade tem seu início no momento de aparecimento da fertilidade em seus aspectos fisiológicos, comportamentais e funcionais; no entanto, todos esses eventos não ocorrem sincronizadamente, por isso, vários parâmetros devem ser combinados para definir o momento em que a característica tem seu início (Freneau, 1996).

Em ambos os sexos, a idade à puberdade, é indicadora de precocidade sexual dos animais, é sumamente importante na seleção reprodutiva, e deve ser considerada ponto relevante nos programas de melhoramento das raças zebuínas (Bergmann, 1999). A herdabilidade da idade à puberdade é considerada alta (0,61), o que indica a possibilidade de ser utilizada como fator de seleção (MacNeil et al., 1984).

Fatores genéticos, condições nutricionais pré e pós desmama, manejo e até linhagem dentro da raça, podem definir direta, e indiretamente, se o animal terá condição de iniciar a puberdade mais precocemente ou não (Garcia et al., 1987).

Do ponto de vista prático, a puberdade é atingida quando há capacidade de liberação de gametas férteis e manifestação do comportamento sexual, fato esse

ocorrendo quando há ajuste gradativo entre aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir, simultaneamente, a esteroidogênese e a gametogênese (Hafez & Hafez, 2004).

2.2.1 Puberdade nos machos

As primeiras mudanças que ocorrem na puberdade são originárias do sistema nervoso central, as quais causam alterações mediadas pela pulsatilidade hipotalâmica de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimulando a hipófise anterior a secretar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Gonzales, 2002), que por sua vez estimulam, respectivamente, a produção de testosterona (T) pelas células de Leydig e a proliferação das células de Sertoli (Parks et al., 2003).

Com o amadurecimento testicular, há maior sensibilidade à ação estimulatória das gonadotrofinas, principalmente com o aumento dos níveis de FSH, proporcionando o início da espermatogênese (Hafez & Hafez, 2004).

A produção de T pelas células de Leydig é controlada pela ação do LH (Hafez & Hafez, 2004). A secreção de LH é pulsátil e ocorre em episódios irregulares a cada duas a quatro horas (Noakes et al., 2001). As células de Leydig, localizadas no tecido intersticial, produzem pulsos de T em resposta à liberação de LH (Chenoweth & Kastelic, 2007). A T permanece concentrada nos túbulos seminíferos pela sua ligação às proteínas ligadoras de andrógenos (ABP). A T é essencial ao funcionamento das células de Sertoli (Amann & Schanbacher, 1983).

Em resposta ao FSH, as células de Sertoli segregam fluidos e ABP (Amann & Schanbacher, 1983). O papel da ABP é manter elevadas as concentrações de andrógenos no lúmen dos túbulos seminíferos e epidídimo (Noakes et al., 2001). A T também apresenta papel direto sobre a espermatogênese. Nesta fase, ocorre aumento do diâmetro e do lúmen dos tubos seminíferos em conjunto com o crescimento rápido dos órgãos genitais primários (Hafez & Hafez, 2004). Em síntese a maior parte da espermatogênese é controlada pela ação do FSH e da T (Ball & Peters, 2004).

Para os machos, o critério mais adotado como referência é que o touro entra na puberdade quando apresenta em seu ejaculado motilidade progressiva $\geq 10\%$ e concentração espermática total de, no mínimo, 50 milhões de espermatozoides (Wolf et al., 1965). O momento da puberdade acontece por volta de quatro semanas após o surgimento das primeiras células espermáticas no ejaculado, e aproximadamente

duas semanas após serem encontrados os primeiros espermatozoides móveis no sêmen (Wolf et al., 1965; Killian & Amann, 1972). Outra forma encontrada na literatura para caracterizar o início da puberdade em machos é apenas identificar o aparecimento de espermatozoides móveis no ejaculado (Foot, 1969; Garcia et al., 1987) ou unicamente o aparecimento de espermatozoide no sêmen coletado (Unanian, 1997).

Nos machos, a identificação do momento da puberdade implica em coletas sucessivas e sequenciais de sêmen em todos os touros jovens candidatos à seleção (Albuquerque & Baldi, 2010).

O conceito de que animais *Bos indicus* são tardios ainda é uma realidade na literatura mundial, pois os mesmos quando comparados aos *Bos taurus* atingem a puberdade mais velhos e mais pesados (Perotto et al., 2001; Nogueira, 2004). Porém, pesquisas brasileiras mostram que bovinos da raça Nelore atingem a puberdade entre 10 e 16 meses, coincidindo com o período de grande ganho de peso associado ao rápido crescimento testicular, aumento da secreção de LH e início da espermatogênese (Cardoso, 1977; Castro et al., 1989; Castro et al., 1990; Unanian, 1997; Costa e Silva et al., 2015).

A medida mais utilizada, na prática, para definir o status puberal é o PE (Lunstra & Echternkamp, 1982). Em raças europeias de corte o PE pode prever mais precisamente o início da puberdade, com uma correlação de 0,65, independentemente da idade, raça ou peso corporal (Lunstra et al., 1978).

Na raça Guzerá, a idade à puberdade dos machos encontrada foi por volta dos 16 a 18,9 meses de idade, com PE apresentando medida de 23 a 25,5 cm. Estudando 207 machos, nos quais 69% atingiram a puberdade com essas características (Torres Júnior & Henry, 2005).

Em programas de melhoramento genético no Brasil, a ênfase de seleção para PE era na medida feita aos 18 meses; entretanto, a partir de 1998, um trabalho com machos Nelore mostrou que o ponto de inflexão (crescimento máximo) na curva de crescimento do PE acontece aos 10,8 meses, o que, segundo os autores, evidenciaria o maior crescimento do parênquima testicular próximo aos 12 meses, sugerindo o início da puberdade (Bergmann et al., 1998).

Correlações genéticas favoráveis (quando as duas características são melhoradas) entre PE aos 12 meses e data do primeiro parto (-0,08) e desfavoráveis entre PE aos 18 meses e idade ao primeiro parto (0,21), evidenciam que a puberdade dos machos também ocorreria por volta dos 12 meses de idade (Gressler et al., 1998).

Se a seleção for realizada com a medida aos 18 meses a maioria dos touros jovens já estará no período pós-púbere, e a seleção para maiores medidas de PE nessa idade, está associada aos maiores pesos corporais e, possivelmente, à menor precocidade reprodutiva em ambientes tropicais (Gressler et al., 1998; Quirino & Bergmann, 1998).

A seleção do aumento do PE não trará benefícios econômicos diretos, porém, o objetivo geral é conseguir animais mais precoces sexualmente (Bergmann, 1999). A medida do PE está correlacionada geneticamente com a idade a puberdade nos machos e fêmeas e com a fertilidade das fêmeas geneticamente ligadas aos machos selecionados (Gressler et al., 1998).

2.2.2 Puberdade nas fêmeas

Nas fêmeas, a puberdade tem sido considerada como a idade na qual a novilha ovula pela primeira vez com manifestação estral (Notter, 1995; Atkins et al, 2013). O fato não pode ser confundido com estro não púbere (que não é seguido por uma fase luteal) ou com ovulação silenciosa que ocorre normalmente antes do estro púbere (Atkins et al., 2013).

Posteriormente ao nascimento das bezerras, a concentração sérica do LH diminui. Após 10 semanas de vida, o mesmo hormônio tem seu nível elevado de forma gradativa, estabelecendo-se até a 22^a semana, quando ocorre o decréscimo na secreção do LH, o que caracteriza uma segunda fase de redução da atividade gonadal. Na puberdade, o aumento na secreção do GnRH provoca um novo aumento na liberação de LH, restabelecendo a atividade gonadal e dando início ao período de maturidade sexual (Evans et al., 1992).

Bovinos, após o nascimento, secretam pequenas quantidades de estradiol (E_2), via folículos ovarianos, responsáveis por manter a supressão na secreção do LH, via retroalimentação negativa (Rodriguez & Wise, 1991). Novilhas pré-puberes ovariectomizadas aumentam a frequência e amplitude de picos de secreção de LH; porém, quando as fêmeas, também ovariectomizadas, receberam doses de E_2 parenteral, a frequência pulsátil de LH diminuiu (Day et al., 1984).

O tratamento constante com doses exógenas de E_2 , no período inicial da pré-puberdade, pode contribuir para dessensibilizar o hipotálamo e levar à puberdade precoce (Schoppee et al., 1995).

Na fase próxima à primeira ovulação, verifica-se um aumento na frequência de

pulsos de LH, conseqüentemente, menor sensibilidade do hipotálamo à retroalimentação negativa exercida pelo E₂ (Evans et al., 1992; Kinder et al., 1995). A frequência de picos de LH aumenta no período de 40 a 80 dias antecedentes a primeira ovulação (Melvin et al., 1999). A concentração de FSH permanece relativamente estável no período que antecede a ovulação (Evans et al., 1994).

Na pré-puberdade, cerca de 30 a 80 dias antes da primeira ovulação, o aumento na frequência da secreção de LH resulta em crescimento dos folículos antrais e aumento da produção de E₂. A concentração plasmática de E₂ em novilhas, permanece baixa até um mês antes da puberdade, quando tem seus níveis aumentados de forma gradual até o momento da primeira ovulação (Nakada et al., 2000).

Em novilhas, a maturação neural que controla a pulsatilidade e a secreção de GnRH, somente está completa após a primeira ovulação, mesmo que os modelos fisiológicos tentem explicar os processos relacionados à puberdade, a exata identificação do mecanismo responsável permanece pouco compreendida (Cardoso & Nogueira, 2007).

A identificação deste momento de entrada na puberdade das fêmeas é bem mais complicada do que dos machos, uma vez que para a identificação correta da primeira ovulação são necessários exames ginecológicos ou dosagens hormonais sucessivas e sequenciais (Albuquerque & Baldi, 2010).

Novilhas Nelore tiveram sua dinâmica folicular estudada ecograficamente dos oito aos 16 meses de idade. Foi observado que a taxa de crescimento folicular (mm/dia) permaneceu constante, entretanto o folículo dominante apresentou maior diâmetro final com o decorrer da idade (De Lucia et al., 2002). No período do estudo 32% das fêmeas tornaram-se gestantes aos 15 meses de idade, o que os autores consideraram precoce, tendo o diâmetro do folículo dominante com maior medida entre 12 e 14 meses. Embora tenha ocorrido um aumento no diâmetro folicular, a concentração sérica de LH, no estudo, não diferiu entre os grupos, sugerindo maior crescimento folicular nas novilhas precoces sem modificar a concentração plasmática de LH. Este resultado corrobora autores que descrevem novilhas *Bos indicus* com maior diâmetro folicular a partir dos 11 meses (Perry et al., 1991).

Outra forma de manejo seria aumentar a mão de obra das propriedades rurais para observação do estro das novilhas, ou o uso de rufiões com marcadores, porém este manejo necessita de mais pessoas no dia-a-dia da propriedade rural. Por esse fato, normalmente as informações reprodutivas das fêmeas são aquelas que estão

associadas à ocorrência de prenhez precoce ou idade ao primeiro parto (Albuquerque & Baldi, 2010).

Devido as dificuldades de identificação do momento exato da entrada na puberdade de touros jovens e novilhas, novos estudos estão buscando o desenvolvimento de novas metodologias preditivas de puberdade precoce. Entre os métodos em estudo, um promissor é a concentração sérica do hormônio AMH que poderá atuar como um marcador para uma possível detecção da puberdade precoce em machos e fêmeas bovinos.

2.3 Hormônio AMH

A primeira função descrita para o AMH foi referente a sua participação na diferenciação sexual no início da vida fetal (Lee et al., 1996; Rajpert-De Meyts et al., 1999). Nos mamíferos há uma fase bipotencial, em que apresentam estruturas embrionárias indiferenciadas, ainda comuns a ambos os sexos (Jost et al., 1970). Na presença do cromossomo Y, o processo de diferenciação é desencadeado pelo fator de determinação testicular através do gene SRY, que induz a formação dos testículos pelas gônadas indiferenciadas (Mello et al., 2005).

Uma função conhecida do AMH, descrita a mais tempo, é como substância inibidora dos ductos de Müller, sendo formada por uma proteína precursora homodimérica, com duas ligações de ponte dissulfeto, apresentando massa molecular de 140 kDa, a qual é clivada proteoliticamente em um fragmento inativo de 110 kDa e um biologicamente ativo, de 25 kDa na região C-terminal (Giulii et al, 1997). Em humanos, a glicoproteína é produzida após o momento em que ocorre a diferenciação dos túbulos seminíferos no testículo fetal até a maturação puberal (Josso et al., 1990). Em ovinos, foi constatado que a forma predominante do AMH no fluido folicular é a dimérica de massa molecular 140 kDa (Campbell et al., 2012).

O AMH é uma glicoproteína membro da superfamília dos fatores de crescimento transformantes β – TGF- β (Cate et al., 1986). Outros componentes dessa família agem no controle de processos reprodutivos, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-15), fator de diferenciação do crescimento-9 (GDF-9), ativina-A, fator de crescimento transformante- β e inibina (Silva et al., 2009).

Para medir a ação do AMH são conhecidas duas classes de receptores de membrana, serina/treonina/kinases. Os do tipo I não tem seus mecanismos de ação

conhecidos, sendo que os mesmos são compartilhados com outros membros da superfamília. Os do tipo II, ao contrário dos membros da TGF- β , são expressos apenas nos órgãos-alvo do AMH, isto é, nos órgãos reprodutivos, onde encontram-se, por exemplo, nas células mesenquimais que circundam os ductos de Müller durante o período de regressão e nas gônadas de ambos os sexos (Baarends et al., 1994; Rocha et al., 2013). Mesmo não sendo conhecidas as funções dos receptores do Tipo I, é necessário que ocorra a sinalização pós-receptor, fazendo-se obrigatória a fosforilação do receptor do tipo I (Domenice et al., 2002).

Com a formação testicular, as células de Leydig produzem T que, em parte, é desdobrada em di-hidrotestosterona (DHT), e as células de Sertoli fazem a síntese de AMH. A T é responsável pelo desenvolvimento dos ductos de Wolf, gerador da genitália masculina interna; já a DHT formará a genitália externa e o AMH, no mesmo período, fará a inibição dos ductos de Müller, para que ocorra a completa diferenciação gonadal masculina (Domenice et al., 2002).

No sexo masculino, o AMH secretado pelas células de Sertoli causa atrofia dos ductos de Müller, que são precursores do útero, cornos uterinos e da porção cranial da vagina. A ausência desse hormônio determina a diferenciação sexual feminina (Behringer et al., 1994; Mishina et al., 1996; Rey et al., 2003).

Uma vez que não se faça presente o cromossomo Y, não há desenvolvimento testicular, o que irá determinar a ausência de AMH e por conseguinte, o ducto de Müller, precursor da genitália feminina interna, continuará seu desenvolvimento. Então, o ovário desenvolve-se produzindo E₂, desencadeando a formação da genitália externa feminina, findando a diferenciação feminina (Borges-Osório & Robinson, 2013).

No homem, o AMH causará a regressão dos ductos de Müller e continuará sendo produzido até a puberdade. Após este período, os níveis decrescem lentamente até atingirem valores residuais. Nas mulheres, o AMH começa a ser produzido em pequenas quantidades pelas células da granulosa ovariana logo após o nascimento até a menopausa, tornando-se indetectável no soro após este período, agindo por meio de uma diminuição da atividade da enzima aromatase nas células da granulosa (Okay, 2003).

O AMH exibe atuação complexa relacionada a presença deste hormônio em tumores da granulosa e da teca em fêmeas e tumores de células de Sertoli em machos, por exemplo. Em animais, os seus níveis séricos se tornam extremamente baixos, não havendo forma de quantificação. Entretanto, em mulheres, esses níveis

serão mais elevados que o padrão, quando as mesmas apresentam tumores ovarianos de célula da granulosa, atuando como marcador específico e sensível (Gustafson et al., 1992; Rey et al., 1996).

Em bovinos o AMH atua como biomarcador (altas concentrações) não invasivo, mais confiável para diagnóstico de tumores das células da granulosa e teca, mesmo quando foi comparado com as concentrações de inibina ou esteroides ovarianos (El-Sheikh Ali et al., 2013).

Estudos com cães machos, de três a 15 anos, para investigar a relação do AMH com tumores nesses animais, detectaram que os portadores de tumor de células de Sertoli, tiveram expressão de AMH através da imunohistoquímica, quando normalmente os cães machos dessa idade não apresentariam nenhuma leitura de AMH, tornando o hormônio um marcador útil de células neoplásicas de Sertoli em cães adultos (Banco et al., 2012).

Em 1986 foi identificado o gene do AMH em humanos (Cate et al., 1986), descrita sua localização no braço curto do cromossomo 19 (Cohen-Haguenauer et al., 1987). Na atualidade novas informações foram descritas, mostrando que apresenta apenas 2,75 kpb de comprimento, com 5 éxons, caracterizando-se por ter muitas ligações guanina-citosina na porção que codifica o domínio bioativo C-terminal (Rey et al., 2003).

Outras espécies também já tiveram o gene do AMH identificado, tais como camundongos (King et al., 1991), ratos (Haqq et al., 1992), e suínos (Lahbib-Mansais et al., 1997).

2.3.1 AMH em machos

O AMH pode ser um marcador da maturação das células de Sertoli na puberdade de humanos do sexo masculino, através de seu receptor do tipo II e o receptor de andrógeno (RA). As células de Sertoli apresentam expressão reduzida do AMH, o que está relacionado intimamente com o aparecimento da espermatogênese (Almeida et al., 2012). Tal fato engloba perda de atividade proliferativa, aparecimento das junções intercelulares e provê suporte à espermatogênese, propondo então que o AMH circulante permaneça baixo durante os dois primeiros dias após o nascimento, mas eleve-se rapidamente, mantendo-se alto até o momento da puberdade, quando sua quantificação decresce a valores mínimos nos adultos (Josso et al., 1990; Lee et al., 1996).

Na fase fetal e neonatal de humanos, devido à insensibilidade androgênica que acontece neste período, as concentrações séricas de AMH e T encontram-se elevadas, dado que as células de Sertoli, as quais são responsáveis por secretar o AMH, não apresentam RA, que por sua vez são encarregados, através de uma ação parácrina, de inibir a secreção de AMH, permitindo que o AMH e a T estejam presentes nessa fase da vida de forma simultânea (Boukari et al., 2009).

Os níveis de AMH controlam a síntese de andrógenos, o que é explicado em camundongos, quando foram encontrados dados que sugerem tal fato. Quando o AMH circulante está em níveis elevados, o hormônio faz a supressão da transcrição do gene P450c17 que codifica a produção tanto da enzima 17,20-desmolase, quanto da enzima 17- α -hidroxilase, sendo as duas substâncias envolvidas na síntese de T (Teixeira et al., 1999), ou seja, quando as concentrações do AMH estão elevadas as de T encontram-se baixas.

Em equinos, o AMH expresso pelas células de Sertoli diminuiu enquanto os RA aumentaram, à medida que houve maturação das funções reprodutivas. Ainda é possível encontrar altas expressões do AMH nas células de Sertoli fetais, neonatais e em testículos pré-púberes (Bilinska et al., 2004; Ball et al., 2008). Ainda em equinos sugere-se que concentrações séricas de AMH são significativamente maiores em potros recém-nascidos, quando comparados às potras e mais elevadas em potros pré-púberes do que em garanhões (Claes et al., 2013). Esses dados sugerem a associação das alterações no que diz respeito à expressão do AMH com seu receptor e a diferenciação das células de Sertoli durante a puberdade (Almeida et al., 2012).

Para suínos, os resultados evidenciam a mesma resposta para expressão do AMH na imunohistoquímica, o qual foi detectado em células de Sertoli de suínos com dois meses de idade, desaparecendo completamente a partir dos seis meses de idade (Kao et al., 2012).

Em humanos, estudos na medicina pediátrica têm sugerido que a dosagem do AMH constitui um instrumento útil para o diagnóstico de puberdade precoce (baixa concentração de AMH) e a puberdade tardia (altas concentrações de AMH), tornando o hormônio um potencial marcador de precocidade sexual (Rey et al., 1993; Perez & Guerra Júnior, 2000). Um grande declínio de AMH é observado quando os valores séricos de T se elevam acima de 1,9 ng/mL (correspondendo ao estágio puberal P3 - desenvolvimento de pelos escuros e ásperos sobre o púbis), independentemente do nível de FSH, já que em puberdade precoce, dependente ou independente de gonadotrofina, a evolução do AMH é a mesma (Perez & Guerra Júnior, 2000).

Relatos de bovinos *Bos taurus*, demonstram diferença quanto aos níveis de AMH circulante em relação a idade. Bezerros Holstein-Friesian mantiveram os altos níveis séricos de AMH até os cinco meses de idade, quando então as concentrações do hormônio baixaram (Rota et al., 2002), mas, para a raça Japanese Black Bull, os dados mostraram comportamento dos níveis de AMH distintos, neste experimento as concentrações de AMH sérico aumentaram do nascimento ($123,5 \pm 9,8$ ng/mL) até o segundo mês de vida ($254,6 \pm 14,1$ ng/mL), quando então as concentrações diminuíram gradativamente até os seis meses ($42,9 \pm 10,0$ ng/mL). Neste mesmo experimento, os níveis de T foram estáveis até o terceiro mês, passando de 1,00 ng/mL no quarto mês e aumentando significativamente a partir do quinto mês de idade dos bezerros (Kitahara et al., 2016).

Em bovinos *Bos indicus* (Nelore), a concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada, comportamento esse inverso ao da T. Nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, em que os níveis de AMH são reduzidos e os da T se elevam, resultados esses que demonstram que o AMH também revela-se como um possível marcador biológico de precocidade sexual em machos bovinos (Queiroz, 2014).

Em bovinos, o início da puberdade está intimamente relacionado à habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do LH produzindo T, que irá atuar controlando a diferenciação das células de Sertoli em várias de suas funções (Boockfor et al., 1983). O FSH também contribui com o processo de diferenciação das células de Sertoli e a síntese de fatores de crescimento por essas células, que promovem a maturação das células de Leydig, tornando-as aptas a responder aos estímulos crescentes do LH (Walker & Cheng, 2005).

Os aumentos mais significativos das concentrações plasmáticas de T coincidiram com as mudanças morfológicas visualizadas no nucléolo e núcleo das células de Sertoli a partir da 26ª semana, em bovinos. Este achado corrobora o conhecimento de que a atividade das células de Leydig influencia a maturação das células de Sertoli através da secreção de T (Aguiar et al., 2006).

Na fase adulta, sugere-se que ocorra uma regulação antagônica entre AMH e T, sendo que a T parece exercer um efeito supressor sobre a secreção do AMH pelas células de Sertoli. Nestes momentos, os RA já estão expressos nas células de Sertoli e a T encontra-se em alta concentração intratesticular. Assim a T atua nos RA, através da ação parácrina, inibindo a secreção do AMH pelas células de Sertoli (Pasqualini et al., 1981; Rey et al., 2003).

2.3.2 AMH nas fêmeas

O AMH é sugerido como atuante nas fêmeas de camundongo no que diz respeito a foliculogênese, pois possui um padrão de expressão nas células da granulosa (Durlinger et al., 2002a). Esse hormônio é encontrado no fluido folicular de mulheres (Takahashi et al., 2008).

Apesar de o AMH ser utilizado como marcador de reserva ovariana e preditor da resposta ovariana em mulheres (Van Rooij et al., 2002), pois seus níveis séricos são mensuráveis, seu papel no desenvolvimento folicular ainda não é bem definido.

Resultados de pesquisas mostram que o AMH atua inibindo a ativação de folículos primordiais e reduzindo a sensibilidade dos folículos em desenvolvimento a ação do FSH em camundongos (Durlinger et al., 1999).

A expressão ovariana de AMH é observada, em mamíferos, nas células de folículos em crescimento através dos receptores específicos do tipo II (AMHRII), sendo que grande parte dos trabalhos propõe a expressão de AMH nas células da granulosa de folículos primários como o início da síntese, e a sua máxima produção em folículos secundários e antrais iniciais (Rocha et al., 2013). Sua atuação envolve atividades relacionadas ao desenvolvimento folicular, desde o controle da formação do folículo primordial até a manutenção da dominância folicular.

2.3.2.1 Ação do AMH na formação de folículos primários

O desenvolvimento folicular em bovinos inicia-se com a ativação dos folículos primordiais, seguido de seu crescimento e desenvolvimento contínuo até culminar com a ovulação ou atresia. Entretanto, os mecanismos precisos envolvidos no controle do início desse crescimento contínuo e na determinação do número de folículos primordiais que começam a crescer ainda não estão bem estabelecidos. O que já foi elucidado é que o crescimento dos folículos pré-antrais parece ser dependente de interações entre o ovócito e as células da granulosa, bem como da secreção de fatores locais (Oliveira et al., 2011).

Diversos mecanismos e elementos estão envolvidos na seleção folicular se inter-relacionando em mecanismos de causa e efeito, com pouco esclarecimento sobre todo o processo envolvido. As gonadotrofinas (GD) e seus receptores e fatores

produzidos localmente estão envolvidos no desenvolvimento folicular e qualidade ovocitária (Webb et al., 2003). No entanto, o real fator desencadeador de todo o processo de seleção ainda permanece desconhecido, embora se entenda que o conjunto de eventos que atuam neste processo seja gradativamente organizado (Oliveira et al, 2011).

O tamanho do *pool* folicular primordial é um processo crítico. Em primatas e ruminantes essa etapa ocorre durante o desenvolvimento fetal e, em roedores, pouco depois do nascimento (Smitz & Cortvrindt, 2002). Durante esses acontecimentos de formação, moléculas de sinalização extracelulares fazem parte do processo, tais como progesterona, estrógeno, fator de necrose tumoral- α , ativina -A e AMH (Morrison & Marcinkiewicz, 2002; Kezel & Skinner, 2003; Bristol-Gould et al., 2006; Rocha et al., 2013).

Foi relatado em um estudo do cultivo *in vitro* de ovários de ratas recém nascidas, que houve diminuição significativa da formação dos folículos primordiais em ovários tratados com AMH (Nilsson et al., 2007). Sugere-se, também, que o AMH tenha papel fundamental na manutenção dos cordões ovígeros para prevenir a formação folicular prematura (Rocha et al., 2013). Isso demonstra que o hormônio pode interferir na formação folicular, retardando a produção de folículos, pois em ovários de ratas neonatas foi encontrada expressão de RNAm para AMH na fase de transição entre ovócitos e folículos primordiais (Kezele et al., 2005).

2.3.2.2 Ação do AMH na ativação de folículos primários

Logo após a formação, a próxima etapa envolvida na foliculogênese é a ativação dos folículos primários, os quais alcançam transformações nas células da pré-granulosa, passando de formato pavimentoso a cuboidal (Martins et al., 2008). Neste ponto, o AMH exerce um efeito inibitório no desenvolvimento de folículos em estágio inicial (Durlinger et al., 1999), em contraste com a maioria dos membros da superfamília TGF- β , que possuem papel estimulatório (Silva et al., 2009).

Há uma redução da metade dos folículos em crescimento, após cultivo de ovários de camundongas neonatas na presença do AMH, indicando que o mesmo exerce controle de inibição do *pool* de folículos primordiais, funcionando como fator de crescimento inibitório durante estágios iniciais (Durlinger et al., 2002b).

Entretanto, em humanos não houve diferença percentual de folículos primordiais nos tecidos ovarianos tratados e não tratados com AMH (Carlsson et al.,

2006), ou até mesmo houve aumento no desenvolvimento de folículos em desenvolvimento, após cultivo de quatro semanas do tecido ovariano (Schmidt et al., 2005).

Um estudo com ovinos *in vivo*, mostraram que há diferença entre espécies na atuação do AMH no processo de ativação folicular, pois quando os animais foram imunizados para o hormônio, o mesmo não afetou a taxa de ativação de folículos primordiais (Campbell et al., 2012).

A maior produção do AMH deriva dos folículos em desenvolvimento (primários, secundários e antrais iniciais), evidenciando que o papel desta substância na ativação folicular primordial ainda é pouco elucidada, apesar de vários estudos na área, o que sugere que existe uma regulação parácrina envolvida nesta categoria folicular (Rocha et al., 2013).

Outro aspecto que não apresenta elucidação completa do papel do AMH é que, mesmo sendo produzido na sua maior quantidade pelos folículos antrais iniciais, o hormônio está envolvido no mecanismo de inibição do *pool* de folículos na emergência folicular (Durlinger et al., 2002a). Fêmeas bovinas *Bos indicus* apresentam maior população folicular em contagem ecográfica e maior concentração de AMH, quando comparadas às *Bos taurus* (Batista et al., 2014), porém foi demonstrado previamente que a população de folículos primordiais foi menor em animais *Bos indicus* do que em *Bos taurus* (Silva-Santos et al., 2011). Com isso, demonstra-se a possibilidade de que a alta concentração plasmática de AMH em novilhas *Bos indicus* contribua para menores taxas de atresia folicular (Baruselli et al., 2015).

2.3.2.3 AMH no crescimento folicular

Logo após a ativação os folículos primordiais evoluem a primários e, a seguir, folículos secundários, compostos por duas a três camadas de células da granulosa e uma camada de células da teca. Até esse momento, o folículo encontra-se em fase pré-antral e, a partir de então, inicia-se o crescimento antral (Van den Hurk & Zhao, 2005).

A fase antral é marcada pela modificação do folículo secundário em terciário, multiplicando as camadas da granulosa e formando a cavidade repleta de fluido, o qual serve como fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras, como gonadotrofinas, esteroides, enzimas proteoglicanas, lipoproteínas e fatores de

crescimento. O desenvolvimento do folículo antral é caracterizado pelo crescimento basal, recrutamento, seleção e dominância (Van den Hurk & Zhao, 2005).

O crescimento folicular pode ser dividido em duas fases, uma responsiva às gonadotrofinas, transição de folículo secundário para terciário, e outra dependente de gonadotrofinas, com crescimento contínuo além do estágio terciário (Kumar et al., 1997). Durante a fase dependente, a sensibilidade individual folicular ao FSH é que define sua seleção ao desenvolvimento ou atresia (Osman, 1985).

Em bovinos, o desenvolvimento folicular até 4 mm não é dependente da ação de gonadotrofinas, sendo causado por outros fatores. Entre 4 e 9 mm o crescimento é dependente de FSH e a necessidade de LH inicia-se a partir de 9 mm de diâmetro, quando o folículo torna-se pré-ovulatório (Gong et al., 1996). Outro fator que acredita-se estar envolvido no processo de seleção folicular é o AMH (Durlinger et al., 2001).

Em células da granulosa de folículos em desenvolvimento, estágio primário até antral inicial, há um padrão de expressão do AMH, o que leva a acreditar que o hormônio tem efeito sobre o crescimento folicular (Weenen et al., 2004).

Em camundongas nocaute para AMH, foi confirmada a hipótese de que existe maior proporção de folículos em desenvolvimento quando comparada com as do grupo controle, independente dos níveis de FSH, o que sugere que, na ausência do AMH, os folículos são mais sensíveis ao FSH (Durlinger et al., 2001); porém em relação ao número de folículos pré-ovulatórios de fêmeas nocaute para AMH, não foram encontradas maiores proporções que a do grupo controle (Durlinger et al., 1999).

Na espécie ovina, os achados não são os mesmos, pois quando a biotividade (imunizadas com anti-AMH) do AMH em ovelhas foi realizada, resultou em uma diminuição dos folículos pré-antrais tardios e antrais iniciais, além de aumentar a proporção de folículos antrais tardios e a taxa de ovulação (Campbell et al., 2012).

O mecanismo de ação do AMH sobre o FSH pode ser explicado por um efeito direto do AMH na transcrição da aromatase, enzima conversora de andrógenos em estrógenos, expressa nas células da granulosa, da mesma forma que os receptores de FSH. Há uma redução dose-dependente na atividade do promotor específico da aromatase ovariana II (Pellat et al., 2011).

Os resultados da literatura são muito conflitantes no que diz respeito à interação AMH e FSH. Em saguis, quando ocorre supressão da ação gonadotrófica, resulta em atenuação da expressão do AMH, o que aponta para uma ação estimulatória do FSH sobre o hormônio (Thomas et al., 2007).

Na espécie bovina os relatos mostram, que no cultivo *in vitro* de células da granulosa na presença de FSH resultou na forte inibição da secreção de AMH pelas células de folículos de 3-5 mm (Rico et al., 2011).

Mesmo com todas as discordâncias literárias a respeito da ação do FSH e do AMH, a maior parte dos estudos indica que o AMH diminui a sensibilidade dos folículos ao FSH, desempenhando, portanto, importante papel na seleção folicular para dominância (Rocha et al., 2013).

Os efeitos do AMH sob a forma com que os folículos respondem ao FSH pode determinar a dinâmica do processo de seleção folicular (Durlinger et al., 2002a). No decorrer da seleção um grupo de folículos é destacado do conjunto de folículos em crescimento, os quais produzem AMH, para que seu desenvolvimento tenha continuidade até o estágio pré-ovulatório (Visser & Themmen, 2005). A concentração de FSH requerida, para continuar crescendo, para cada folículo, dependerá do estágio em que o mesmo se encontra (Mcgee & Hsueh, 2000). Uma vez afetada a sensibilidade dos folículos ao FSH, o AMH pode desempenhar papel importante, determinando a progressão de alguns folículos até a ovulação (Rocha et al., 2013).

O papel inibitório do AMH na ativação de folículos primordiais para o *pool* folicular, como já citado anteriormente, tem o papel de evitar a depleção prematura da população folicular (Baruselli et al., 2015). A concentração sérica do AMH decresce assim como o número de folículos ovarianos conforme a idade em roedores (Kevenaar et al., 2006) e mulheres (Piltonen et al., 2005). Em bovinos, foi verificada, recentemente, maior concentração plasmática de AMH em bezerras quando comparadas às novilhas ciclando, independente se *Bos indicus* ou *Bos taurus* (Batista et al., 2015).

2.3.2.4 AMH como marcador de reserva ovariana

Medir diretamente o *pool* de folículos primordiais é impossível, sendo uma estimativa indireta, feita a partir do número de folículos em crescimento (Scheffer et al., 1999). Então, encontrar um fator primariamente secretado pelos folículos em crescimento reproduzirá o tamanho da onda de folículos primordiais (Scheffer et al., 2007).

Van Rooij et al. (2002) foram os primeiros autores a sugerir que a concentração sérica basal de AMH, no terceiro dia do ciclo, poderia funcionar como um marcador da função ovariana. O AMH expresso pelos folículos em crescimento até a dominância

(Durlinger et al., 2002a; Durlinger et al., 2002b) pode ser detectado em nível sanguíneo (Lee et al., 1996, Scheffer et al., 2011), o que faz deste hormônio um potencial marcador de reserva ovariana e *pool* folicular.

O marcador de reserva ovariana mais utilizado na atualidade é o nível basal de FSH; porém, pode não expressar na totalidade os resultados quando comparados com o AMH. Registros na literatura mostram que os níveis basais de AMH permanecem constantes (20-25 pmol/L) entre 18 e 29 anos de idade, e a partir dos 30 anos começam a cair rapidamente, atingindo 10 pmol/L por volta dos 37 anos em mulheres. Mesmo com a queda de 50% do AMH, os níveis basais de FSH praticamente não se alteram, sugerindo que o AMH é um marcador da reserva ovariana superior aos níveis basais de FSH (Tremellen et al., 2005)

O AMH tem pouca oscilação dos seus níveis plasmáticos durante todo o ciclo menstrual em mulheres, ao contrário do que acontece com o LH, FSH e estradiol (E₂), indicando que sua dosagem pode ser feita em qualquer momento do ciclo, com uma única mensuração (Hehenkamp et al., 2006). O mesmo pode ser concluído em relação ao fato de diferença entre ciclos, sendo que a dosagem do AMH é um critério superior a contagem de folículos antrais (CFA) e mensuração sérica de inibina-B, E₂, FSH e LH (Fanchin et al., 2003, 2005a; Van Rooij et al., 2005; Van Disseldorp et al., 2010; Satwik et al., 2012).

Ainda em mulheres a literatura demonstra que valores iguais ou inferiores a 1,26 ng/mL indicam redução da reserva ovariana, com sensibilidade de 97% (Gnoth et al., 2008). O AMH é preditivo da menopausa, sendo que a associação entre o seu nível sérico e idade feminina pode ser uma predição da época aproximada em que tal fato vai ocorrer (Broer et al., 2011).

Existe correlação positiva de 0,77 dos valores séricos de AMH e o número de folículos antrais em mulheres (Van Rooij et al., 2002); porém, a maior concentração de AMH é encontrada no fluido folicular de pequenos folículos antrais, quando comparado aos folículos pré-ovulatórios, salientando que os níveis séricos do hormônio refletem o *pool* de pequenos folículos antrais (Andersen & Byskov, 2006).

Os resultados em bovinos mostram o AMH como um marcador de reserva ovariana em potencial desenvolvimento. Avaliações seriadas de bovinos de 12 a 18 meses, demonstraram que as fêmeas com maior CFA (mais de 25 folículos maiores que 3 mm) possuem alta expressão de RNAm para AMH nas células da granulosa, enquanto animais com baixa contagem (menor que 15 folículos) tem AMH em níveis mais baixos. Outro ponto importante é de que a CFA apresenta alta repetibilidade

dentro de um ciclo estral; esse fato não se repete entre os animais da mesma espécie, sendo observadas variações de até sete vezes de um indivíduo para outro (Ireland et al., 2008; Souza et al., 2015). Fato que mostra variação entre fêmeas, no entanto alta repetibilidade em um mesmo indivíduo (Ireland et al., 2008; Monniaux et al., 2012).

A amostra sanguínea pode ser coletada em qualquer momento do ciclo estral para mensurar o AMH (Baruselli et al., 2015). Porém, quando fêmea passa por um tratamento superestimulatório com FSH, esta característica não tem a mesma resposta, pois a concentração de AMH parece ser maior que os níveis fisiológicos normais. Este fato deve ser devido ao crescimento de pequenos folículos que não são detectáveis pela imagem ultrassonográfica, ou que o tratamento com FSH aumente a secreção de AMH pelas células da granulosa, necessitando de mais estudos para definir esse parâmetro (Rico et al., 2009; Rico et al., 2012).

A dosagem de AMH em bovinos, mostra-se estreitamente relacionada ao número de folículos antrais de 3-7 mm de diâmetro. Essa porcentagem de folículos da população ovariana possui uma maior concentração folicular do AMH e expressão de RNAm para o hormônio (Rico et al., 2009).

O AMH segue perfil específico durante o ciclo estral, que ocorre independentemente das ondas foliculares em vacas. O padrão de secreção indica que, após o primeiro estro, há diminuição dos níveis do hormônio, seguida por aumento até alcançar o segundo estro (Rico et al., 2011).

Em bovinos o AMH apresenta correlação positiva com a população ovariana de folículos antrais de diferentes grupos genéticos (Baldrighi et al., 2013; Batista et al., 2014), havendo grande variação na concentração do AMH entre os grupos (Batista et al., 2014; Guerreiro et al., 2014; Ribeiro et al., 2014).

Quando foram comparadas fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, as primeiras apresentaram maior população ovariana de folículos antrais e concentração superior de AMH (Batista et al., 2014).

Em ovinos, a concentração plasmática de AMH é um marcador confiável do status ovariano de borregas pré-púberes, podendo ser esse valor útil na seleção de ovelhas de reposição com maior fertilidade (Lahoz et al., 2012).

2.3.2.5 AMH na produção de embriões *in vitro* (PIV)

Os níveis séricos de AMH podem ter valor significativo na prática, pois são um marcador preditivo da resposta ovariana para pacientes submetidos à produção de

embriões *in vitro* (PIV), refletindo a reserva ovariana (Beckers et al., 2002). O número de ovócitos recuperados está diretamente relacionado aos níveis séricos de AMH, apresentando correlação positiva de 0,57 em humanos (Van Rooij et al., 2002).

Trabalhos demonstram relação positiva do AMH com a qualidade ovocitária em mulheres (Fachin et al., 2005ab), número de ovócitos aspirados (Riggs et al., 2011) e taxa de gestação e nascimento vivos (Glicher et al., 2010). Os níveis de AMH no fluido folicular relacionaram-se significativamente com a taxa de fertilização dos ovócitos, em geral, os níveis de AMH dos ovócitos fertilizados foram 3,42 vezes maiores que os não fertilizados: $2,40 \pm 3,48$ ng/mL; $0,70 \pm 1,01$ ng/mL (Takahashi et al., 2008).

Em mulheres existe correlação moderada e positiva dos níveis de AMH basal com o número de embriões em estágio de clivagem, sugerindo que a concentração de AMH pode ter correlação moderada com o desenvolvimento de blastocistos na PIV (Sills et al., 2011).

O AMH, juntamente com a idade da mulher, podem ser utilizados para estimar a chance de sucesso do procedimento de PIV em casais inférteis, nos quais o fator masculino seja descartado (Lee et al., 2009; La Marca et al., 2011). Em mulheres jovens a concentração do AMH também pode ser utilizada para prever o resultado da recuperação de ovócitos após estimulação ovariana, porém os resultados deste estudo não levaram em consideração a taxa de gestação (Riggs et al., 2011).

A concentração do AMH no terceiro dia do ciclo menstrual apresenta correlação com CFA, número de ovócitos recuperados na aspiração folicular, número de embriões obtidos e nível de AMH no 18º e 20º dias, sendo inversamente relacionada à idade e ao nível de FSH. O mesmo trabalho mostrou que o AMH está relacionado à taxa de gestação obtida em programas de PIV, sendo que valores acima de 1,15 ng/mL determinam maior chance de gravidez (Martins, 2012).

A avaliação da capacidade de produção de embriões de uma doadora bovina pode ser estimada pelo nível sérico de AMH (Monniaux et al., 2010). O mesmo pode ser observado para cabras, em que a concentração circulante de AMH é capaz de prever a capacidade de uma doadora produzir número elevado ou baixo de embriões de alta qualidade (Monniaux et al., 2011).

2.4 Cronobiologia

A produção animal está relacionada às suas possibilidades de produtividade biológica, o que depende de muitos fatores como fluxo de energia e sua

adaptabilidade ao ambiente de criação (Starling et al., 2005). A cronobiologia é entendida como a ciência ou disciplina que estuda os ritmos biológicos presentes nos organismos vivos e as estruturas anatômicas e mecanismos fisiológicos em que estes se baseiam (Silva & Nobre, 1993).

Do ponto de vista da cronobiologia, a reprodução é um conjunto de ritmos agrupados dentro de outro ritmo de maior periodicidade (De la Inglesia & Schawartz, 2006).

Curvas de resposta obtidas de várias espécies animais e vegetais mostram que fatores ambientais, tais como iluminação, temperatura e manejo têm efeito importante sobre a expressão do ritmo endógeno, promovendo ajustes através de mecanismos biológicos específicos e dentro de limites bem definidos para cada espécie (Rotenberg et al., 1997).

Os sinais cíclicos ambientais com períodos estáveis, permitem que os organismos se adaptem ao meio, e antecipar as mudanças periódicas de luz e temperatura. Ciclos geofísicos regulares parecem ter efeito em uma pressão de seleção sobre os seres vivos, esta influência se observa na persistência dos ritmos em condições constantes de sua duração correspondente, com a ritmicidade de aproximadamente 24 horas (Pittendrigh, 1993).

Para compreensão das ações hormonais é necessário o conhecimento do seu ritmo biológico. As manifestações ocorrem em períodos que podem variar de milissegundos, como o disparo de neurônios ou batimento de flagelos de espermatozoides, até mesmo anos, como o ciclo reprodutivo da cigarra americana que varia de 13 a 17 anos (Marques et al., 1997).

A origem endógena das oscilações circadianas em um organismo, requer um mecanismo à nível celular e molecular que são controlados por formas genicas de retroalimentação e transcrição-tradução (Moor & Eichler, 1972). A maquinaria molecular do relógio circadiano está presente em todas as células (Schibler & Sassone-Corsi, 2002).

O padrão temporal do ritmo biológico pode ser classificado de acordo com a duração do seu período em ritmo circadiano (do latim *circa* – em torno de; e *dien* – dia), cujo período estende-se de 20 a 28 horas, dependendo da espécie; ritmos não-circadianos, agrupados em infradiano, que é um ritmo de baixa frequência, com períodos maiores que 28 horas, como exemplo o ciclo reprodutivo e a produção de plaquetas no sangue de mamíferos (7 dias); e ultradianos, oscilações de batimento rápido, com períodos que podem chegar a 20 horas, como é o caso dos batimentos

cardíacos e da respiração (Marques & Menna-Barreto, 2003; Tapia & Anaya, 2016). Em resumo, os ritmos circadianos: são endógeno, multisistêmicos e capaz de sincronizar as mudanças ambientais (Tapia & Anaya, 2016).

Existem muitas controvérsias acerca dos ritmos que não têm correlatos ambientais. Os ritmos não-circadianos são em alguns casos, contestados por cronobiologistas, que alertam ao fato desses ritmos não serem de fácil caracterização, tal como se faz com os ritmos circadianos. Ao contestar, os autores explicam que os ritmos ultradianos são considerados como pulsatilidade dos sistemas fisiológicos, e os infradianos seriam consequência natural do intervalo de maturação ou desenvolvimento de organismos e processos (Hastings et al., 1991).

Nem todos os ritmos não-circadianos estão desagregados de um ciclo ambiental, pois o ciclo das estações do ano controla diversos fenômenos biológicos em habitats muito diversos. O ciclo lunar e seus correlatos, as marés, são importantes para muitas espécies, relacionadas com as frequência rápida e lenta, sendo dependentes dos dois pulsos diários de atividade, cheia e vazante, configurando, dessa forma, um ritmo ultradiano. Outros ritmos como os da reprodução, tem suas fases ligadas à determinadas fases do ciclo lunar, que apresenta aproximadamente 29 dias, sendo, portanto, infradiano (Marques et al., 1997).

Os ritmos circadianos são determinados por um relógio biológico determinado geneticamente, que é capaz de sincronizar diariamente o ciclo luz e escuro (Pittendrigh, 1993). A sincronização do relógio circadiano resulta da interação entre osciladores endógenos e variáveis cíclicas ambientais (Aschoff, 1960).

O ritmo circadiano é intrínseco a determinados hormônios. A ritmicidade ultradiana serve para controlar a ocorrência de processos metabólicos e comportamentais em uma série de eventos simultâneos com eficiência máxima (Araujo & Marques, 1997). O começo do sono, no ciclo claro/escuro, apresenta efeito de ajuste de fase sobre a ritmicidade ultradiana da secreção de todos os hormônios influenciados pelo sono (prolactina, GH e o LH na puberdade). O momento no qual existe aumento da magnitude do GH e do LH na puberdade, está associado ao sono, depende da hora circadiana em que o sono ocorre (Van Cauter & Refetoff, 1985). Em seres humanos, as concentrações de GH durante a noite (22:00 às 23:00 horas) são mais elevadas, e as de cortisol menores, o que se inverte no período matinal (6:00 às 8:00 horas) (Eiler, 2006).

Para exemplificar, o cortisol plasmático resulta de uma sucessão de pulsos de secreção da glândula supra-renal em que a magnitude é modulada por um ritmo

circadiano (Van Cauter & Honickx, 1985). Como exemplo de ritmo ultradiano/circadiano Snop et al. (1994) estudaram a secreção de cortisol em ovinos, os autores identificaram variações cíclicas nas concentrações, com aumento ao nascer do sol, próximo à noite, no começo da tarde e durante a noite. Em algumas espécies, as concentrações sanguíneas de cortisol são mais altas durante as primeiras horas da manhã do que em qualquer outro período, já o ultradiano um bom modelo é o pico de LH pré-ovulatório associado a ovulação mensal (Eiler, 2006).

As interligações existentes nos ritmos biológicos de um organismo produzem uma sequência denominada de organização temporal interna (Marques & Menna-Barreto, 2003), tal qual a liberação de cortisol precedendo o despertar (Bailey & Heitkemer, 2001) e a diminuição da temperatura central acompanhando o sono (Rogers et al., 2007).

Vários fatores parecem ter efeito pronunciado sobre o padrão ultradiano de alguns hormônios, principalmente aqueles ligados ao ciclo estral e reprodutivo (Marques & Menna-Barreto, 2003). Os hormônios sofrem flutuações secretoras que podem variar de frequência e amplitude, referidas com episódios, picos, elevações, pulsos ou explosões secretoras. Os pulsos podem suceder um aumento frequentemente de duas a cinco vezes ou raramente de dez a vinte vezes a concentração plasmática (Eiler, 2006).

A relação infradiana e circadiana também existe, vários animais que vivem em zona temperada, apresentam seu ciclo reprodutivo em uma determinada época do ano (Bronson, 1987), porém alguns fatos envolvendo o ciclo estral acontecem em momentos considerados circadianos, por exemplo com eventos relacionados ao estro, como a ovulação, o início da receptividade sexual, ocorrendo em momentos determinados do dia, nos dias em que eles ocorrem (Keefe & Turek, 1985).

O melhor modelo da riqueza de processos fisiológicos e comportamentais envolvendo diferentes frequências em distintos momentos, são provavelmente os mecanismos envolvidos nos ciclos reprodutivos. Os ritmos associados com a reprodução cobrem amplo espectro de frequências, passando por liberações pulsáteis de hormônios até a faixa infradiana, envolvendo o ciclo estral, a sazonalidade, os ritmos anuais de reprodução e nascimento, passando por temporização circadiana de alguns fatores envolvidos no processo (Follet & Follet, 1981).

No sistema neuroendócrino o modo de secreção de hormônios é pulsátil e controlado por um gerador de pulsos no hipotálamo, que por sua vez, tem seu controle regido por informações nervosas e sinais de *feedback* da eminência média do

hipotálamo, glândula hipófise e gônadas. Por outro lado, o gerador de pulsos também assegura que as características dos sinais enviados pela hipófise e gônada sejam modulados promovendo respostas adequadas dos tecidos-alvo no trato reprodutivo (Benites & Baruselli, 2006).

Muitos eventos relacionados com a reprodução variam com o padrão circadiano. Porém a expressão hormonal pulsátil é modulada de maneira circadiana, seja na sua amplitude de variação, seja na frequência da própria pulsatilidade hormonal (Turek & Van Cauter, 1988).

O termo pulsatilidade é amplamente utilizado para descrever os ritmos ultradianos de atividade secretora de glândulas endócrinas, conhecidos como micropulsos de secreção de hormônios. Gambacciani et al. (1987), descrevem pulsatilidade intrínseca, independente de estímulos hipotalâmicos para LH, GH e prolactina em preparação perfundida da hipófise anterior *in vitro*.

Em mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos (NQS) funcionam como osciladores circadianos (Golobek et al., 1997) e são considerados os principais marcadores de tempo nesses animais (Marques & Menna-Barreto, 2003). No entanto, ainda discute-se a existência de outros moduladores, que não necessariamente estão situados no mesmo local, mas que seriam capazes de modificar o ritmo biológico (Menna-Barreto, 2005).

Ao longo da vida há mudanças no sistema responsável por temporizar o ritmo circadiano. Alguns ritmos biológicos já apresentam-se ainda na vida fetal, outros aparecem bem mais tarde durante a puberdade, e muitos irão se alterar com a chegada da senilidade. Com o passar do tempo, ocorrem mudanças no sistema temporizador circadiano como, por exemplo, o avanço de fase no ritmo de vigília/sono, de temperatura corporal e de secreção hormonal (Menna-Barreto & Wey, 2007). Outra alteração que acontece com o envelhecimento é a diminuição na amplitude do ritmo (Van Someren et al., 2002).

O ritmo dos hormônios envolvidos com a reprodução são um exemplo dentre os ritmos que diminuem a amplitude. Esses hormônios estão sob o controle do sistema nervoso central, que através do hipotálamo que produz o GnRH, o qual, regula a liberação do FSH, e do LH (Baker, 2007).

A secreção de GnRH se apresenta de duas formas, uma pulsátil caracterizada por pulsos de alta frequência e baixa amplitude, que ocorre quando há baixas concentrações de E₂, o que ocasiona a inibição da secreção do GnRH e LH (Chappell, 2005). A outra forma é cíclica, caracterizada por apresentar um pico elevado durante

a fase pré-ovulatória, quando as altas concentrações de E₂ retroalimentam positivamente a secreção de GnRH e LH. Este aumento na liberação maciça de GnRH é requerido para induzir um pico nos níveis de LH, indispensável para desencadear a ovulação (Schneider, 2004).

Em 2010, um estudo com humanos do sexo masculino, evidenciou a ontogênese do hormônio AMH nas diferentes fase da vida e momentos do dia. Os ritmos de liberação deste hormônio possuem variação individual dos níveis séricos, porém sem detecção de alteração em momentos distintos do dia. Os resultados quanto a liberação em relação às fases da vida mostram os mais altos níveis pós-nascimento até aos 3 meses de idade, diminuindo em 12 meses e mantendo-se estável durante toda infância até a puberdade, quando o AMH diminui progressivamente, com o adulto exibindo 3 a 4% dos níveis infantis (Aksglaede et al., 2010).

O ritmo de secreção de AMH de fêmeas e machos bovinos não está estabelecido e o conhecimento desse padrão é de suma importância, para que parâmetros clínicos de comparação de momento de dosagem sejam estabelecidos.

Em resumo, pode-se dizer que o estudo de ritmos de secreção hormonal na pecuária e produção animal envolve crescimento, reprodução, produção e saúde do rebanho, o que justifica cada vez mais a realização de pesquisas com o uso da cronobiologia na área (Marques & Menna-Barreto, 2003).

3 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. V.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. de A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, ago. 2006. Suplemento.
- AKSGLAEDE, L.; SORENSEN, K.; BOAS, M.; MOURITSEN, A.; HAGEN, C.P.; JENSEN, R.B.; PETERSEN, J.H.; LINNEBERG, A.; ANDERSSON, A.-M.; MAIN, K.M.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A. Changes in Anti-Müllerian Hormone (AMH) throughout the Life Span: A Population-Based Study of 1027 Healthy Males from Birth (Cord Blood) to the Age of 69 Years. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 12, p. 5357–5364, 2010.
- ALBUQUERQUE, L. G.; BALDI, F. Seleção para precocidade sexual de zebuínos: situação atual e perspectivas. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7., 2010, Viçosa, **Anais...** Viçosa: Ed. Suprema, p. 299-324, 2010.
- ALMEIDA, J.; CONLEY, A. J.; MATHEWSON, L.; BALL, B. A. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. **Theriogenology**, [S.l.], v. 77, n. 5, p. 847-857, Mar. 2012.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, supl. 2, p. 380-403, 1983.
- ANDERSEN, C. Y.; BYSKOV, A. G. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: Analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 91, n. 10, p.4064-4069, Oct. 2006.
- ARAUJO, J. F.; MARQUES, N. Intermodulação de frequências dos ritmos biológicos. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. (Orgs.). **Cronobiologia: Princípios e aplicações**. São Paulo: EDUSP, p. 85-96, 1997.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v. 25, p.11-28, 1960
- ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 479-492, Nov. 2013.
- BAILEY, S. L.; HEITKEMPER, M. M. Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. **Chronobiology international**. [S.l.], v. 18, n. 2, p. 249-261, Mar. 2001.
- BAARENDS, W. M.; VAN HELMOND, M. J.; POST, M.; VAN DER SCHOOT, P. J.; HOOGERBRUGGE, J. W.; DE WINTER, J. P.; UILENBROEK, J. T.; KARELS, B.; WILMING, L. G.; MEIJERS, J. H.; THEMME, A. P. N.; GROOTEGOED, J. A. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. **Development**, [S.l.], v. 120, n.1, p.189-197, Jan. 1994.

BAKER, F. C. Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. **Sleep Medicine**, Rochester, v. 8, n. 6, p. 613-622, Sept. 2007.

BALDRIGHI, J. M.; SIQUEIRA, A. F.; ASSIS, P. M.; SÁ FILHO, M. F.; VISINTIN, J. A.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Hormonal evaluation during the ovulatory cycle of Holstein, Gir and buffalo heifers at the same environment and nutritional management. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 10, p. 415. 2013.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Bull fertility**. In: Reproduction in Cattle (Oxford: Blackwell Publi), 3 ed., 28-39, 2004.

BALL, B. A.; CONLEY, A. J.; GRUNDY, S. A.; SABEUR, K.; LIU, I. K. Expression of anti-Müllerian hormone (HAM) in the equine testis. **Theriogenology**, [S.l.], v. 69, n. 5, p. 624-631, Mar. 2008.

BANCO, B.; VERONESI, M. C.; GIUDICE, C.; ROTA, A.; GRIECO V. Immunohistochemical evaluation of the expression of anti-Müllerian hormone in mature, immature and neoplastic canine Sertoli cells. **Journal of Comparative Pathology**, [S.l.], v. 146, n.1, p. 18-23, Jan. 2012.

BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. H. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 487-497, July/Sept. 2015.

BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R.; RENNÓ, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction Domestic Animals**, [S.l.], v. 49, n. 3, p. 448-452, June 2014.

BATISTA, E. O. S.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; SILVA, J. C. B.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; RESENDE, R. G.; BASSO, A. C.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. **Domestic Animal Endocrinology**, [S.l.], v. 54, p. 1-9, Jan. 2015.

BECKERS, N. G.; MACKLON, N. S.; EIJKEMANS, M. J.; FAUSER, B. C. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 78, n. 2, p. 291-297, Aug. 2002.

BERGMANN, J. A. G.; QUIRINO, C. R.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; PEREIRA, J. C. C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. **Theriogenology**, New York, v. 52, n. 1, p. 25-34, July 1998.

BERGMANN, J. A. G. Seleção de Zebuínos para Precocidade Sexual. SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., Viçosa, **Anais...** Viçosa: Ed. Suprema, p. 51-59, 1999.

BEHRINGER, R. R.; FINEGOLD, M. J.; CATE, R. L. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. **Cell.**, [S.l.], v. 79, n. 3, p. 415-425, Nov. 1994.

BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S. Medicamentos empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. p.343-361, 2006.

BILINSKA, B.; HEJMEJ, A.; PAWLAK, M.; SADOWSKA, J.; TISCHNER, M. Immuno expression of androgen receptors in testes of immature and mature stallions. **Equine Veterinary Journal**, [S.l.], v.36, p. 539–543, 2004.

BOOCKFOR, F. R.; BARNES, M. A.; DICKEY, J. F. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the Holstein bull on *in vitro* Leydig cell response. **Journal of Animal Science**, [S.l.], v. 56, n. 6, p. 1386-1392, June 1983.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 784p, 2013.

BOUKARI, K.; MEDURI, G.; BRAILLY-TABARD, S.; GUIBOURDENCHE, J.; CIAMPI, M. L.; MASSIN, N. MARTINERIE, L.; PICARD, J. Y.; REY, R.; LOMBÈS, M.; YOUNG, J. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 94, n. 5, p.1818-1825, May 2009.

BRISTOL-GOULD, S. K.; KREEGER, P. K.; SELKIRK, C. G.; KILEN, S. M.; COOK, R. W.; KIPP, J. L.; SHEA, L. D.; MAYO, K. E.; WOODRUFF, T. K. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology**, [S.l.], v. 298, n. 1, p. 132-148, Oct. 2006.

BROER, S. L.; EIJKEMANS, M. J. C.; SCHEFFER, G. J.; VAN ROOIJ, I. A.; DE VET, A.; THEMEN, A. P.; LAVEN, J. S.; DE JONG, F. H.; TE VELDE, E. R.; FAUSER, B. C.; BROEKMANS, F. J. Anti-Müllerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 96, n. 8, p. 2532-2539, Aug. 2011.

BRONSON, F.H. Seasonal breeding. In: PLANT, T. M.; ZELENZNIK, A. J. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press Ltda. p. 1831-1871, 1987.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. 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 Reproduction**, [S.l.], v. 73, n.1, p. 54-62, July 2005.

CAMPBELL, B. K.; CLINTON, M.; WEBB, R. The role of Anti-Müllerian hormone (HAM) during follicle development in a monovulatory species (sheep). **Endocrinology**, [S. l.], v. 153, n. 9, p. 4533-4543, Sept. 2012.

CARDOSO, F. M. **Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebu (*Bos indicus*), da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade**. 1977. 113f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G. P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia da Unopar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, jan./jun. 2007.

CARLSSON, I. B.; SCOTT, J. E.; VISSER, J. A.; RITVOS, O.; THEMME, A. P.; HOVATTA, O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 21, n. 9, p. 2223-2227, Sept. 2006.

CASTRO, V. M.; VALE FILHO, V. R.; REIS, S. R.; OLIVEIRA, H. N. Puberdade e início de maturação sexual em touros Nelore, de 10-14 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v. 1, p. 183, 1989. Suplemento 1.

CASTRO, V. M.; VALE FILHO, V. R.; REIS, S. R.; OLIVEIRA, H. N. Circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos de touros Nelore, de 10 aos 24 meses de idade, criados a pasto, na região de Montes Claros- MG. **In: CONGRESSO MINEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 4., Belo Horizonte, p. 18-19, 1990.

CATE, R. L.; MATTALIANO, R. J.; HESSION, C.; TIZARD, R.; FARBER, N. M.; CHEUNG, A.; NINFA, E. G.; FREY, A. Z.; GASH, D. J.; CHOW, E. P.; FISHER, R. A.; BERTONIS, J. M.; TORRES, G.; BERTONIS, J. M.; RAMACHANDRAN, K. L.; RAGIN, R. C.; MANGANARO, T. F.; MACLAUGHLIN, D. T.; DONAHOE, P. K. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. **Cell.**, [S.l.], v. 45, n. 5, p. 685-698, June 1986.

CERVIERI, R. **Produção intensiva de carne de qualidade será tema de curso online em agosto**. 2012. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/producao-intensiva-de-carne-de-qualidade-sera-tema-de-curso-online-em-agosto/>>. Acesso em: 22 abr. 2016.

CHAPPELL, P. E. Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, n. 2, p.119-30, 2005.

CHENOWETH, P. J.; KASTELIC, J. P. **Clinical Reproductive Physiology and Endocrinology of Bulls**. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology (St. Louis, MO:Saunders Elseviers), 2 ed., p. 221-228, 2007.

CLAES, A.; BALL, B. A.; ALMEIDA, J.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**, [S.l.], v. 79, n. 9, p. 1229-1235, June 2013.

COHEN-HAGUENAUER, O.; PICARD, J. Y.; MATTEI, M. G.; SERERO, S.; NGUYEN, V. C.; DE TAND, M. F.; GUERRIER, D.; HORS-CAYLA, M. C.; JOSSO, N.; FRÉZAL, J. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. **Cytogenetics and Cell Genetics**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 2-6, 1987.

COSTA E SILVA, E. V.; COSTA FILHO, L. C. C.; SOUZA, C. C.; OLIVEIRA, C. C.; QUEIROZ, V. L. D.; ZUCCARI, C. E. S. N. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 22-31, 2015.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D. D.; SCHANBACHER, B. D.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: oestradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 31, n. 2, p. 332-341, Sept. 1984.

DE LA IGLESIA, H. O.; SCHWARTZ, W. J. Timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p.1148-1153, 2006.

DE LUCIA, R. F. S.; PEREIRA, F. V.; NOGUEIRA, G. P. Follicular population in precocious and non precocious Nelore heifers during prepubertal period. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 57, p. 603, 2002. Supplement 1.

DIAS, L. T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimativas de herdabilidade para perímetro escrotal para animais da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 3962-3966, dez. 2003. Suplemento 2.

DIAS, L. T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L. G. Efeito da idade de exposição das novilhas à reprodução sobre estimativas de herdabilidade da idade ao primeiro parto em bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 370-373, jun. 2004.

DOMENICE, S.; COSTA, E. M. S.; CORRÊA, R. V.; MENDONÇA, B. B. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual (revisão). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 433-443, ago. 2002.

DURLINGER, A. L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMMEN, A. P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, [S.l.], v. 140, n. 12, p. 5789-5796, Dec. 1999.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T. R.; MATZUK, M. M.; ROSE, U. M.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMMEN, A. P. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, [S.l.], v. 142, n. 11, p. 4891-4899, Nov. 2001.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H. A.; NACHTIGAL, M. W.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMMEN, A. P. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, [S.l.], v. 143, n. 3, p. 1076-1084, Mar. 2002a.

DURLINGER, A. L.; VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. **Reproduction**, [S.l.], v. 124, n. 5, p. 601-609, Nov. 2002b.

EILER, H. Glândulas Endócrinas. In: REECE, W. O. (Orgs). **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. p. 577-622. 2006.

ELER, J. P.; SILVA, J. A.; FERRAZ, J. B.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H. N.; EVANS, J. L.; GOLDEN, B. L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. **Journal of Animal Science**, [S.l.], v. 80, n. 4, p. 951-954, Apr. 2002.

ELER, J. P.; SILVA, J. A.; EVANS, J. L.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; GOLDEN B. L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, [S.l.], v. 82, n. 9, p. 2519-2527, Sept. 2004.

EL-SHEIKH, ALI H.; KITAHARA, G.; NIBE, K., YAMAGUCHI, R.; HORII, Y.; ZAABEL, S.; OSAWA, T. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. **Theriogenology**, [S.l.], v. 80, n. 8, p. 940-949, Nov. 2013.

EVANS A. C. O.; CURRIE, W. D.; RAWLINGS, N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 96, n. 2, p. 847-855, Nov. 1992.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 100, n. 1, p. 187-194, Jan. 1994.

FANCHIN, R.; SCHONAUER, L. S.; RIGHINI, C.; GUIBOUDENCHE, J.; FRYDMAN, R.; TAIEB, J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 323-327, Feb. 2003.

FANCHIN, R.; LOUAFI, N.; MENDEZ LOZANO, D. H.; FRYDMAN, N.; FRYDMAN, R.; TAIEB, J. Per-follicle measurements indicate that anti-Mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 84, n. 1, p. 167-173, July 2005a.

FANCHIN, R.; TAIEB, J.; MENDEZ LOZANO, D. H.; DUCOT, B.; FRYDMAN, R.; BOUYER, J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 923-927, Apr. 2005b.

FOLLET, B. K.; FOLLET, D. E. (Eds.). **Biological Clocks in Seasonal Reproductive**. Bristol: Sciencetechnica. 1981.

FOOT, R. H. Physiological aspect of artificial insemination. In: COLE, H. H.; CUPPS, P. (Eds.). **Reproduction in Domestic Animals**. 2. ed. New York: Academic Press, 1969.

FRANCO, G. L; BRUMATTI, R, C. Cadeia produtiva da carne bovina. In: OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. F. (Orgs.). **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologia**. Salvador: EDUFBA. p. 17-22, 2007.

FRENEAU, G. E. **Biopsia testicular aberta efetuada na puberdade e na pós-puberdade e suas consequências sobre a gametogênese e o sêmen de touros Nelore**. 1996. 167p. Tese (Doutorado em Ciência Animal)–Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

FRIES, L. A. Critérios de seleção para um sistema de produção de carne bovina em ciclo curto. In: OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. F. (Orgs.). **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologia**. Salvador: EDUFBA, p. 127-165, 2007.

FRIES, L. A; ALBUQUERQUE, L. G. Prenhez aos catorze meses: presente e futuro. Elementos do componente genético. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, p. 227-239.

GAMBACCIANI, M.; LIU, J. H.; SWARTZ, W. H.; TUEROS, V. S.; RASMUSSEN, D. D.; YEN, S. S. C. Intrinsic pulsatility of ACTH release from the human pituitary in vitro. **Clinical Endocrinology to Oxford**, [S.l.], v. 26, n. 5, p. 557-563, May 1987.

GARCIA, J. M.; PINHEIRO, L. E. L.; OKUDA, H. T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Ars Veterinária**, [S.l.], v. 3, p. 47-53, 1987.

GIULI, G.; SHEN, W. H.; INGRAHAM, H. A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, *in vivo*. **Development**, [S.l.], v. 124, n. 9, p. 1799-1807, May 1997.

GLEICHER, N.; WEGHOFER, A.; BARAD, D. H. Anti-Müllerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. **Fertility and Sterility**. [S.l.], v. 94, n. 7, p. 2824-2827, Dec. 2010.

GNOTH, C.; SCHURING, A. N.; FRIOL, K.; TIGGES, J.; MALLMANN, P.; GODEHARDT, E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 23, n. 6, p.1359-1365, June 2008.

GOLOMBEK, D.; CARDINALI, D.; AGUILAR-ROBLERO, R. Mecanismo de Temporização em Vertebrados. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. (Orgs.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: EDUSP. p. 138-161.1997.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone, and Ovarian Follicle Development in Heifers Continuously Infused with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 55, n. 1, p. 68-74, July 1996.

GONZALES, F. H. D. Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. **Laboratório de Bioquímica Clínica Animal**. Porto Alegre, 2002.

GRESSLER, S. L.; BERGMANN, J. A. G., PENNA, V. M.; PEREIRA, C. S.; PEREIRA, J. C. C. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. v. 3, p. 368-370.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUX, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.; ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestical Animal Endocrinology**, [S.l.], v. 49, p. 96-104, Oct. 2014.

GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S. E. F.; SIQUEIRA, J. B.; PINHO, R. O.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; SILVA, M. R.; BORGES, J. C. Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 379-388, 2011. Suplemento especial.

GUSTAFSON, M. L.; LEE, M. M.; SCULLY, R. E.; MONCURE, A. C.; HIRAKAWA, T.; GOODMAN, A.; MUNTZ, H. G.; DONAHOE, P. K.; MACLAUGHLIN, D. T.; FULLER, A. F. JR. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovaries sex-cord tumor. **The New England Journal of Medicine**, [S.l.], v. 326, n. 7, p. 466-471, Feb. 1992.

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

HAQQ, C.; LEE, M. M.; TIZARD, R.; WYSK, M.; DEMARINIS, J.; DONAHOE, P. K.; CATE, R. L. Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. **Genomics**. [S.l.], v. 12, n. 4, p. 665-669. Apr. 1992.

HASTINGS, J. W.; RUSAK, B.; BOULOS, Z. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: LADD PROSSER, C. (Ed.). **Neural and Integrative animal Physiology**. New York: Part B Edition. p. 435-546, 1991.

HEHENKAMP, W. J.; LOOMAN, C. W.; THEMMEN, A. P.; JONG, F. H.; VELDE, E. R.; BROCKMANS, F. J. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. **Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, [S.l.], v. 91, n. 10, p. 4057-4063, Oct. 2006.

IRELAND, J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. 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**, [S.l.], v. 22, n. 6, p. 1687-1695, June 2007.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMMEN, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 79, n. 6, p. 1219-1225, Nov. 2008.

JOSSO, N.; LEGEAI, L.; FOREST, M. G.; CHAUSSAIN, J. L.; BRAUNER, R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 70, n. 1, p. 23-27, Jan. 1990.

JOST, A.; PRICE, D.; EDWARDS, R. G. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 259, n. 828, p. 119-130, Aug. 1970.

KAO, E.; VILLALON, R.; RIBEIRO, S.; BERGER, T. Role for endogenous estrogen in prepubertal Sertoli Cell maturation. **Animal Reproduction Science**. Davis, v. 135, n. 1-4, p. 106-112, Nov. 2012.

KEEFE, D. L.; TUREK, F. W. Circadian time keeping processes in mammalian reproduction. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, Oxford, v. 7, p. 346-400, 1985.

KEVENAAR, M. E.; MEERASAIB, M. F.; KRAMER, P.; VAN DE LANG-BORN, B. M.; DE JONG, F. H.; GROOME, N. P.; THEMME, A. P.; VISSER, J. A. Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3228-3234, July 2006.

KEZELE, P. R.; AGUE, J. M.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. **Biology of Reproduction**. [S.l.], v. 72, n. 1, p. 241-255, Jan. 2005.

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

KILLIAN, G. J.; AMANN, R. P. Reproductive capacity in beef bulls: IX. Changes in reproductive organ weights and semen characteristics of Holstein bulls during the first thirty weeks after puberty. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 55, n. 11, p. 1631-1635, June 1972.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 49, p. 393- 407, Feb. 1995. Supplement 1.

KING, T. R.; LEE, B. K.; BEHRINGER, R. R.; EICHER, E. M. Mapping anti-müllerian hormone (AMH) and related sequences in the mouse: identification of a new region of homology between MMU10 and HSA19p. **Genomics**. [S.l.], v. 11, n. 2, p. 273-283. Oct. 1991.

KITAHARA, G.; KAMATA, R.; SASAKI, Y.; EL-SHEIKH ALI, H.; MIDO, S.; KOBAYASHI, I.; HEMMI, K.; OSAWA, T. Change in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 57, p. 127-132, 2016.

KUMAR, T. R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M. M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**. [S.l.], v. 15, n. 2, p. 201-204. Feb. 1997.

LAHBIB-MANSAIS, Y.; BARBOSA, A.; YERLE, M.; PARMA, P.; MILAN, D.; PAILHOUS, E.; GELLIN, J.; COTINOT, C. Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. **Cytogenetics Cell Genetics**. [S.l.], v. 76, n. 1-2, p. 109-114. 1997.

LAHOZ, B., ALABART, J. L., MONNIAUX, D., MERMILLOD, P., FOLCH, J. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepuberal ewe lambs as a predictor of their fertility a young age. **BMC Veterinary Research**. v. 8, n. 118, p.2-9, 2012.

LA MARCA, A.; NELSON, S. M.; SIGHINOLFI, G.; MANNA, M.; BARALDI, E.; ROLE, L.; XELLA, S.; MARSELLA, T.; TAGLIASACCHI, D.; D'AMICO, R. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 4, p. 341-349, Apr. 2011.

LEE, M. M.; DONAHOE, P. K.; HASEGAWA, T.; SILVERMAN, B.; CRIST, G. B.; BEST, S.; HASEGAWA, Y.; NOTO, R. A.; SCHOENFELD, D.; MACLAUGHLIN, D. T. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.I.]. v. 81, n. 2, p. 571-576, Feb. 1996.

LEE, T. H.; LIU, C. H.; HUANG, C. C.; HSIEH, K. C.; LIN, P. M.; LEE, M. S. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S.I.], v. 17, n.7, p. 100, Sept. 2009.

LÔBO, R. B.; REYES, A. de los; BEZERRA, L. A. S. *et al.* Parâmetros fenotípicos e genéticos de pesos e perímetro escrotal às idades-padrão em animais da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília, **Anais...** Brasília: SBZ, 1995, p. 625-627.

LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, [S.I.], v. 46, n. 4, p.1054-1062, Apr. 1978.

LUNSTRA, D. D.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal Animal Science**, [S.I.], v. 55, n. 3, p. 638-648, Sept. 1982.

MARCONDES, C. R.; BERGMANN J. A.; ELER J. P.; FERRAZ, J. B. S.; PEREIRA, J. C. C.; PENNA, V. M. Análise de alguns critérios de seleção para características de crescimento na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 83-89, fev. 2000.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3. ed. São Paulo: EDUSP. 2003.

MARQUES, M. D. M.; GOLOMBECK, D.; MORENO, C. Adaptação Temporal. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. (Orgs.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: EDUSP. p. 45-84. 1997.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 1, p. 36-49, jan./mar. 2008.

MARTINS, C. P. R. **Fatores prognósticos em terapia e reprodução assistida: hormônio anti-muleriano e secreção endometrial de urocortina**. 2012. 100p. Tese

(Doutorado em Saúde da Mulher)–Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

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

MacNEIL, M. D., CUNDIFF, L. V., DINKEL, C. A., KOCH, R. M. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **Journal Animal Science**, [S.l.], v. 58, n. 5, p. 1171-1180, May 1984.

MELLO, M. P.; ASSUMPÇÃO, J. G.; HACKEL, C. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 14-25, fev. 2005.

MELVIN, E. J.; LINDSEY, B. R.; QUINTAL-FRANCO, J.; ZANELLA, E.; FIKE, K. E.; VAN TASSELL, C. P.; KINDER, J. E. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, n. 2, p. 405-412, Feb. 1999.

MENNA-BARRETO, L. Relógio Biológico – prazo de validade esgotado? **Neurociências**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 1-4, 2005.

MENNA-BARRETO, L.; WEY, D. Ontogênese do Sistema de temporização – A construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. **Psicologia USP**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 133-153, 2007.

MERCADANTE, M. E. Z.; LOBO, R. B.; OLIVEIRA, H. N. Estimativas de (co)variâncias entre características de reprodução e de crescimento em fêmeas de um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 997-1004, ago. 2000.

MISHINA, Y.; REY, R.; FINEGOLD, M. J.; MATZUK, M. M.; JOSSO, N.; CATE, R. L. BEHRINGER, R. R. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. **Genes & Development**, [S.l.], v. 10, n. 20, p. 2577-2587, Oct. 1996.

MONNIAUX, D.; BARBEY, S.; RICO, C.; FABRE, S.; GALLARD, Y.; LARROQUE, H. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? **Reproduction Fertility and Development Journal Impact e Description**, [S.l.], v. 22, n. 7, p. 1083-1091, 2010.

MONNIAUX, D.; BARIL, G.; LAINE, A. L.; JARRIER, P.; POULIN, N.; COGNIE, J.; FABER, S. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**, [S.l.], v. 142, n. 6, p. 845-854, Dec. 2011.

MONNIAUX, D.; DROUILHET, L.; RICO, C.; ESTIENNE, A.; JARRIER, P.; TOUZÉ, J.-L.; SAPA, J.; PHOCAS, F.; DUPONT, J.; DALBIÈS-TRAN, R.; FABRE, S. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. **Reproduction Fertility and Development Journal Impact e Description**, [S.l.], v. 25, n. 1, p.1-16, 2012.

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. **Brain Research**, v. 42, n. 1, p.201-206, 1972.

MORRISON, L. J.; MARCINKIEWICZ, J. L. Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. **Biology of Reproduction**. [S.l.], v. 66, n. 2, p. 450-457, 2002.

NAKADA, K.; MORIOYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 β , testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 57-69, 2000.

NILSSON, E.; ROGERS, N.; SKINNER M. K. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. **Reproduction**. [S.l.], v. 134, n. 2, p. 209-221, 2007.

NOAKES, D. E.; PARKISON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Normal reproduction in male animals**. In: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics (W.B. Saunders), 8 ed., p. 673-694, 2001.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 82-83, p. 361-372, 2004.

NOTTER, D. R. **Maximizing fertility in animal breeding programs**. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute State University, Department of Animal and Poultry Sciences. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 11., 1995, Belo Horizonte, Pré-congresso. 1995. p. inreg.

OKAY, T. S. Hormônio anti-mulleriano: importância na prática pediátrica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, n. 1, p.1-23, 2003.

OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, R. M.; MINGOTI, G. Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 418-432, out./dez. 2011.

OSMAN, P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. **Journal of Reproduction and Fertility**. [S.l.], v. 73, n. 1, p. 261-270. 1985.

PARKS, J. E.; LEE, D. R.; HUANG, S.; KAPROTH, M. T. Prospects for spermatogenesis in vitro. **Theriogenology**, v. 59, p. 73-86, 2003.

PASQUALINI, T.; CEMES, H.; RIVAROLA, M. A. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. **Clinical Endocrinology**, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 545-554, Dec. 1981.

PATTERSON, D. J.; WOOD, S. L.; RANDLE, R. F. Procedimentos que dão suporte ao manejo reprodutivo de novilhas de corte de reposição. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. **Curso...** Uberlândia, 2006. p. 106-127.

PELLATT, L.; RICE, S.; DILAVER, N.; HESHRI, A.; GALEA, R.; BRINCAT, M.; BROWN, K.; SIMPSON, E. R.; MASON, H. D. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 96, n. 5, p. 1246-1251, 2011.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, p. 1676-1683, 2000.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de algumas características reprodutivas e suas relações com o desempenho ponderal na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 720-727, dez. 2001.

PEREIRA, J. C. C.; AYALA, J. M. N.; OLIVEIRA, H. N. Efeitos genéticos e não-genéticos sobre a idade ao primeiro parto e o intervalo entre partos de duas populações da raça Nelore. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 1, p. 93-102, 1991.

PEREZ, E. G. S., GUERRA JÚNIOR, G. Hormônio Anti-Mülleriano: Revisão e contribuição para a investigação das ambigüidades genitais. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 425-433, out. 2000.

PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J. J. S.; KROETZ, I. A. Produtividade à desmama de novilhas Nelore e F1 *Bos taurus* x Nelore e *Bos indicus* x Nelore [Productivity to weaning of Nelore and F1 Guzerath x Nelore and *Bos taurus* x Nelore Heifers]. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 1712-1719, 2001.

PERRY, R. C.; CORAH, L. R.; COCHRAN, R. C.; BRETHOUR, J. R.; OLSON, K. C.; HIGGINS, J. J. Effect of hay quality, breed and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. **Journal of Production Agriculture**, [S.l.], v. 4, p. 13-18, 1991.

PILTONEN, T.; MORIN-PAPUNEN, L.; KOIVUNEN, R.; PERHEENTUPA, A.; RUOKONEN, A.; TAPANAINEN, J. S. Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 20, p. 1820-1826, 2005.

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual Review of Physiology**, v. 55, n. 1, p.16-54, 1993.

QUEIROZ, V. L. D. **Hormônio anti-Mulleriano e puberdade em machos Nelore**. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia, Universidade federal de mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

QUIRINO, C. R.; BERGMANN, J. A. G. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nellore bulls using uni and bivariate animal models. **Theroigenology**, [S.l.], v. 48, n. 7, p. 1398-1396, 1998.

RAJPERT-DE MEYTS, E.; JØRGENSEN N.; GRAEM, N.; MÜLLER J., CATE, R. L.; SKAKKEBAEK, N. E. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and

pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells 1. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.l.], v. 84, n. 10, p. 3836-3844, Oct. 1999.

REY, R. A.; LORDEREAU-RICHARD, L.; CAREL, J. C.; BARBET, P.; CATE, R. L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J. L.; JOSSO, N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.l.], v. 77, n. 5, p.1220-1226, Nov. 1993.

REY, R. A.; LHOMMÉ, C.; MARCILLAC, L.; LAHLOU, N.; DUVILLARD, P.; JOSSO, N.; BIDART, J. M. Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of ovary: Comparative study with serum a-inhibin and estradiol. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S.l.], v. 174, p. 958-965, 1996.

REY, R.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRÁS, P. HAM/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S.l.], v. 211, p. 21-31, 2003.

RIBEIRO, E. S.; BISINOTTO, R. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; MORRISON, A.; KUMAR, A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 97, n. 11, p. 6888-6900, Nov. 2014.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONToux, M.; TOUZÉ, J-L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; RÉMY, B.; BECKERS, J-F.; MONNIAUX, D. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 80, n. 1, p. 50-59. Jan. 2009.

RICO, C.; MÉDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONToux, M.; CLÉMENT, F.; MONNIAUX, D. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology of Reproduction**. [S.l.], v. 84, n. 3, p. 560-571, 2011.

RICO, C.; DROUILHET, L.; SALVETTI, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZÉ, J-L.; PILLET, E.; PONSART, C.; FABRE, S.; MONNIAUX, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. **Reproduction Fertility and Development**, [S.l.], v. 24, p. 932-944, 2012.

RIGGS, R.; KIMBLE, T.; OEHNINGER, S.; BOCCA, S.; ZHAO, Y.; LEADER, B.; STADTMAUER, L. Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 95, n. 1, p. 410-412, Jan. 2011.

ROCHA, R. M. P.; ALVES, A. M. C. V.; LIMA, L. F.; ARAUJO, V. R.; BERNUCI, M. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (HAM). **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 41, p. 1-12, Feb. 2013.

RODRIGUEZ, R. E.; WISE, M. E. Advancement of postnatal pulsatile luteinizing hormone secretion in the bull calf by pulsatile administration of gonadotropin realising hormone during infantile development. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 44, p. 432-439, 1991.

ROGERS, N. L.; BOWES, J.; LUSHINGTON, K.; DAWSON, D. Thermoregulatory changes around the time of sleep onset. **Sleep**, Rochester, v. 90, n. 4, p. 643-647, 2007.

ROTA, A.; BALLARIN, C.; VIGIER, B.; COZZI, B.; REY, R. Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**. v. 129, p. 39-44, 2002.

ROTENBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. Desenvolvimento da Cronobiologia. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. (Orgs.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: EDUSP. 1997. p. 23-44.

SATWIK, R.; KOCCHAR, M.; GUPTA, S. M.; MAJUMDAR, A. Anti-Müllerian hormone cut-off values for predicting poor ovarian response to exogenous ovarian stimulation in in-vitro fertilization. **Journal of Human Reproductive Sciences**, [S.l.], v. 5, n. 2, 2012.

SCHEFFER, G. J.; BROEKMANS, F. J.; DORLAND, M.; HABBEMA, J. D.; LOOMAN, C. W.; VELDE, E. R. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 72, n. 5, p. 845-851, 1999.

SCHEFFER, J. B.; LOZANO, D. M.; FRYDMAN, R.; FACHIN, R. Relação entre os níveis séricos do hormônio anti-Mulleriano, inibina B, estradiol e hormônio folículo estimulante no terceiro dia e o status folicular ovariano. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 24, p. 186-191, abr. 2007.

SCHEFFER, J. B.; SCHEFFER, R. F. B., PIMENTA, E. L., SCHEFFER, B. B. Conhecimento atual do hormônio anti-mulleriano (AMH). **JBRA Assist. Reproduction**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 5, p. 44-48, 2011.

SCHIBLER, U.; SASSONE-CORSI, P. A web of circadian pacemakers: **Cell**. v. 111, n. 7, p.919-922, 2002.

SCHMIDT, K. L.; KRYGER-BAGGESEN, N.; BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles *in vitro*. **Molecular and Cellular Endocrinology**. [S.l.], v. 234, n. 1-2, p. 87-93, 2005.

SCHNEIDER, J. E. Energy balance and reproduction. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p.289-317, 2004.

SCHOPPEE, P. D., ARMSTRONG, J. D.; HARVEY, R. W.; WASHBURN, S. P.; FELIX, A.; CAMPBELL, R. M. Endocrine and ovarian responses to exogenous estradiol-17 β

in 6-month-old heifers previously immunized against growth hormone-releasing factor. **Journal of Animal Science**, Philadelphia, v. 73, p. 2071-2078, 1995.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J. A. I.; ALBUQUERQUE, L. G. Associação genética da prenhez aos 16 meses com o peso à desmama e o ganho de peso em animais da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 1211-1217, 2009.

SILLS, E. S.; COLLINS, G. S.; BRADY, A. C.; WALSH, D. J.; MARRON, K. D.; PECK, A. C.; WALSH, A. P.; SALEM, R. D. Bivariate analysis of basal serum anti-Müllerian hormone measurements and human blastocyst development after IVF. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S.l.], v. 2, n. 9, p. 153, Dec. 2011.

SILVA, J. A. I. I. V.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; OLIVEIRA, H. N. Análise genética da habilidade de permanência em fêmeas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 598-604, jun. 2003a.

SILVA, J. A. I. I. V.; VAN MELIS, M. H.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Estimação de parâmetros genéticos para probabilidade de prenhez aos 14 meses e altura na garupa em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1141-1146, out. 2003b.

SILVA, L. F. P. Interface da nutrição com a reprodução: o que fazer? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CBRA, 2005, CD-ROM.

SILVA, J. A. I. I. V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1568-1572, 2005.

SILVA, J. R. V.; LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R. A superfamília dos fatores de crescimento transformante- β e o controle da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 149-160, jul./set. 2009.

SILVA, P. M. S.; NOBRE, F. L. Ritmos Biológicos no homem. **Acta Médica Portuguesa**. v. 6, p.95-99, 1993.

SILVA-SANTOS, K. C., SANTOS, G. M. G., SILOTO, L. S., HERTEL, M. F., ANDRADE, E. R., RUBIN, M. I. B., STURION, L., MELO-STERZA, F. A., SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos Taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**. v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SMITZ, J. E. J.; CORTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, [S.l.], v. 123, n. 2, p. 185-202, Feb. 2002.

SNOP, T.; CEBULIJ-KADUNC, N.; CESTNIK, V.; PARDUBSKY, T.; TRENTI, F. Biorhythmicity of cortisol and thyroid hormones in the Jezersko-Solchava breed of sheep. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 18., Bologna, 1994. **Proceedings...** Bologna, 1994. v. 2, p.1573-1576.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P.; ROZNER, A.; VIEIRA, L.; HACKBART, K.; BENDER, R.; DRESCH, A.; VERSTEGEN, J.; SHAVER, R.; WILTBANK, M. Relationship

between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 98, n. 1, p. 169-178, Jan. 2015.

STARLING, J. M. C.; SILVA, R. G.; NEGRÃO, J. A.; MAIA, A. S. C.; BUENO, A. R. Variação estacional dos hormônios tireóidea nos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2064-2073, 2005.

TAKAHASHI, C.; FUJITO, A.; KAZUKA, M.; SUGIYAMA, R.; ITO, H.; ISAKA, K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 89, n. 3, p. 586-591, 2008.

TAPIA, C. R. J.; ANAYA, M. M. El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción. **Entreciencias**. v. 4, n. 10, p.147-163, 2016.

THOMAS, F. H.; TELFER, E. E.; FRASER, H. M. Expression of anti-Mullerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary *in vivo* is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, [S.l.], v.148, n. 5, p. 2273-2281, 2007.

TEIXEIRA, J.; FYNN-THOMPSON, E.; PAYNE, A. H.; DONAHOE, P. K. Müllerian inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. **Endocrinology**, [S.l.], v. 140, p. 4732-738, 1999.

TERAKADO A. N.; PEREIRA, M. C.; YOKOO, M. J. I.; ALBUQUERQUE, L. G. Influência da precocidade sexual de fêmeas na mortalidade pré e pós-natal de bezerros da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras, 2008

TERAKADO A. N.; PEREIRA, M. C.; YOKOO, M. J. I.; ALBUQUERQUE, L. G. Influência da precocidade sexual na habilidade de permanência de fêmeas no rebanho, em bovinos da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DASOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA: Inovação Científica e Tecnológica em Zootecnia. 46., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá, 2009a.

TERAKADO A. N.; PEREIRA, M. C.; YOKOO, M. J. I.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo do desempenho das fêmeas sexualmente precoces e da sua progênie em um rebanho da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA: Inovação Científica e Tecnológica em Zootecnia, 46., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá, 2009b.

TORRES JÚNIOR, J. R.; HENRY, M. Sexual development of Guzarat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction**, [S.l.], v. 2, n. 2, p.114-121, 2005.

TREMELLEN, K. P.; KOLO, M.; GILMORE, A.; LEKAMGE, D. N. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. **Australian and NZJ Ostetricis and Gynaecology**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 20-24, 2005.

TUREK, F. W.; VAN CAUTER, E. Rhythms in reproduction. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Eds.). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. p. 1789-1830.1988.

UNANIAN, M. M. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In: O NELORE DO SÉCULO XXI, 4., 1997, Uberaba, **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1997, p. 51-57.

VAN CAUTER, E.; HONICKX, E. The pulsatility of pituitary hormones. In: SCHULZ, H.; LAVIE, P. (Orgs.). **Ultradian Rhythms in Physiology and Behavior**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. p. 41-60.

VAN CAUTER, E.; REFETOFF, S. Multifactorial control of the 24-hour secretory profiles of pituitary hormones. **Journal Endocrinology Investigation**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 381-391, Aug. 1985.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, [S.l.], v. 63, n. 6, p.1717-1751, Apr. 2005.

VAN DISSELDORP, J.; LAMBALK, C. B.; KWEE, J.; LOOMAN, C. W.; EIJKEMANS, M. J.; FAUSER, B. C.; BROEKMANS, F. J. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 221-227, 2010.

VAN ROOIJ, I. A.; BROEKMANS, F. J.; VELDE, E. R. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 17, n. 12, p. 3061-3071, Dec. 2002.

VAN ROOIJ, I. A. J.; BROEKMANS, F. J. M.; SCHEFFER, G. J.; LOMAN, C. W.; HABBEMA, J. D.; DE JONG, F. H.; FAUSER, B. J.; THEMMEN, A. P.; TE VELDE, E. R. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. **Fertility and Sterility**, [S.l.], v. 83, n. 4, p. 979-987, Apr. 2005.

VAN SOMEREN, E. J.; RAYMANN, R. J.; SCHERDER, E. J.; DAANEN, H. A.; SWAAB, D. F. Circadian and age-related modulation of thermoreception and temperature regulation: mechanisms and functional implications. **Ageing Research Reviews**. [S.l.], v.1, n. 4, p. 721-778, 2002.

VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. **Molecular and Cell Endocrinology**, [S.l.], v. 234, n. 1-2, p. 81-86, 2005.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, [S.l.], v. 130, n. 1, p. 15-28, July 2005.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Suppl.**, v. 61, p. 71-90, 2003.

WEENEN, C.; LAVEN, J. S.; VON BERGH, A. R.; CRANFIELD, M.; GROOME N. P.; VISSER, J. A.; KRAMER, P.; FAUSER, B. C.; THEMME, A. P. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**. Oxford, v. 10, n. 2, p. 77-83, 2004.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. **Journal Animal Science**, [S.I.], v. 224, n. 3, p.761-765, 1965.

WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; WOLFE, P. L.; DAY, M. L.; KOCH, R. M.; KINDER, J. E. Effect of selection for growth traits on age and weight at puberty in bovine females. **Journal of Animal Science**, Philadelphia, v. 68, p. 1595-1602, 1990.

YOKOO, M. J. I.; ALBUQUERQUE, L. G.; LÔBO, R. B.; SAINZ, R. D.; ARAUJO, F. R. C.; BEZERRA, L. A. F.; CARNEIRO JÚNIOR, J. M. Estimativas de parâmetros genéticos para altura do posterior, peso e circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 761-1768, 2007.

Ritmo de secreção do hormônio Anti-Mülleriano (AMH) de macho e fêmea Nelore

Secretion rhythm of the Anti-Müllerian hormone (AMH) of male and female Nelore

Resumo- Inicialmente o hormônio Anti-Mülleriano (AMH) foi estudado apenas na diferenciação sexual masculina, porém novos estudos mostram que o AMH pode ter mais ações em diferentes fases da vida dos bovinos. Na pediatria o AMH já é utilizado como marcador de puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e tardia (altas concentrações de AMH). Para estudos mais completos e dinâmicos com o AMH é necessário conhecer seu ritmo de secreção. O objetivo deste trabalho foi determinar o ritmo de secreção do AMH durante 24 horas em fêmeas e machos Nelore nas condições de campo. Utilizou-se seis machos e seis fêmeas Nelore, idade inicial de 10-11 meses finalizando com 14-15 meses. Durante quatro meses (novembro de 2013 a fevereiro de 2014) os animais foram pesados, e as análises reprodutivas realizadas. As fêmeas foram submetidas a exames ginecológico para verificação de sua ciclicidade e, nos machos as medidas de perímetro escrotal (PE), volume testicular, e exame andrológico. A coleta de sangue para realização do ritmo de circadiano do AMH foi feita nos meses de novembro e janeiro; nos meses de dezembro e fevereiro coletou-se apenas uma vez ao dia para acompanhamento mensal dos níveis do AMH. Realizou-se oito coletas num intervalo de 24 horas, intercaladas em 3 horas: 09:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 24:00, 03:00 e 06:00 horas, estabelecendo-se uma curva diária. Nos machos, assim como nas fêmeas, a análise de variância não revelou efeito significativo do horário nos valores do AMH ($P>0,05$), porém existe um ritmo de secreção individual de cada animal. Desta feita, a coleta sanguínea para o AMH pode ser realizada em qualquer horário, sem interferir na interpretação clínica.

Palavras-Chave: bovinos, hormônio, reprodução

Abstract- Previously the anti-Müllerian Hormone (AMH) was studied only in male sexual differentiation. However new studies demonstrate that AMH might have further actions in different stages of bovine's life. In pediatrics, AMH is already used as a marker of precocious puberty (low concentrations of AMH) and delayed (high concentrations of AMH). For more complete and dynamic studies with AMH is necessary to know its rhythm of secretion. The objective of this research was to determine the rhythm of AMH secretion during 24 hours in Nelore females and males. Six Nelore males and six females were kept on the field, starting at age of 10 to 11 months and ending 14 to 15-month-old. For four months (November 2013 to February 2014) the animals were weighed and the reproductive analyzes were performed. The females were submitted to gynecological exams to check their cyclicity and, for males, the scrotal perimeter (PE), testicular volume and andrological examination were performed. Blood collection to analyze the AMH circadian rhythm was done between November and January; on December and February blood was draw only once a day for monthly follow up of AMH levels. Eight collections were performed into a 24-hour interval, inserted by 3 hours: 09:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 24:00, 03:00 and 06:00 hours, determining a daily curve. In males, as well as in females, analysis of variance did not reveal a significant effect of time on AMH values ($P> 0.05$) however there is an individual secretion rhythm for each animal. Therefore, blood collection for AMH can be performed at any time, without interfering on clinical interpretation.

Keywords: bovine, hormone, reproduction

Introdução

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é uma glicoproteína homodimérica, produzida a partir do momento que ocorre a diferenciação dos túbulos seminíferos no testículo fetal à maturação puberal em seres humanos [1]. Ele é secretado pelas células de Sertoli presentes nos testículos, as quais são de suma importância para a ocorrência da diferenciação celular, formação dos testículos e espermatogênese. Elas estão entre as primeiras células a se diferenciar nas gônadas fetais do macho e promove a secreção do AMH responsável pela regressão do ducto de Müller [2,3,4].

Inicialmente o AMH foi estudado apenas na diferenciação sexual masculina [5,6], porém na fêmea, o padrão das concentrações do AMH nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento, sugere importante função do mesmo na foliculogênese [7,8,9]. Existe relato de que, em ovinos, o AMH predomina no fluido folicular [10]. A maior concentração no fluido folicular é encontrada nos folículos antrais iniciais [7,11,12,13].

O AMH apresenta seus níveis séricos mensuráveis, podendo ser utilizado na prática como marcador biológico. Em fêmeas, a principal função ainda é na predição de resposta ovariana [14] e do sucesso do tratamento para fertilização *in vitro* [15]; em machos, a maioria dos estudos estão relacionados ao AMH no fluido seminal e à performance da espermatogênese [16,17], além de ter suas dosagens empregadas para diagnósticos oncológicos de células de Sertoli [18].

Outros estudos na medicina pediátrica de humanos têm sugerido que a quantificação do AMH constitui um instrumento útil para o diagnóstico de puberdade precoce (baixa concentração de AMH) e a puberdade tardia (alta concentração de AMH), tornando-o um potencial marcador de precocidade sexual [19,20].

Em bovinos machos Nelore, a concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada, comportamento esse inverso ao da testosterona (T). Nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, quando os níveis de AMH decrescem e os da T se elevam, resultados esses que indicam que o AMH revela-se como um possível marcador biológico de precocidade sexual em machos bovinos [21].

O ritmo circadiano de secreção do AMH de fêmeas e machos bovinos não está estabelecido e o conhecimento desse padrão é de suma importância, para que parâmetros clínicos de comparação de momento de dosagem do AMH sejam estabelecidos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o ritmo de secreção do AMH durante 24 horas em fêmeas e machos Nelore nas condições de campo.

Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo a manipulação dos animais durante a fase experimental aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo nº 511/2013.

Os animais Nelore utilizados no experimento estavam alocados no município de Dois Irmãos do Buriti, Mato Grosso do Sul (20°41'23"S, 55°16'43"W, altitude de 310 metros, precipitação pluviométrica anual variando de 1000 a 1500 mm).

Utilizou-se seis fêmeas e seis machos Nelore, mantidos em pastagem de *Brachiaria sp.* em sistema rotacionado, com piquetes de 2 ha, recebendo água *ad libitum* em praças de alimentação. A mineralização era fornecida diariamente, sendo oferecidos 300 g/cabeça/dia de mineral proteico com 25% de PB.

Os animais iniciaram o experimento com idade entre 10-11 meses e finalizaram as coletas entre 14 e 15 meses de idade. O trabalho teve início no mês de novembro de 2013 terminando em fevereiro de 2014. Nos quatro meses (novembro - coleta 1; dezembro - coleta 2; janeiro – coleta 3; fevereiro – coleta 4) todos os animais foram pesados, e submetidos às análises reprodutivas. Nas fêmeas, realizou-se um exame ginecológico para verificação de sua ciclicidade e, nos machos, as medidas de perímetro escrotal (PE), volume testicular, e exame andrológico.

O exame ginecológico foi realizado por meio de ultrassonografia, utilizando um ultrassom Mindray DP2200 com transdutor de 7 MHz, registrando-se o diâmetro do maior folículo nos dois ovários e a presença de corpo lúteo.

Os tourinhos que apresentaram PE ≥ 19 cm foram submetidos à eletroejaculação para coleta de sêmen. Os tourinhos que após a coleta de sêmen atingiram a concentração espermática total do ejaculado mínima de 50×10^6 e motilidade $\geq 10\%$ foram considerados púberes, classificação definida por Wolf et al. (1965) [22]. A motilidade progressiva, o vigor e a concentração espermática foram estimadas em microscopia óptica de campo claro, sob aumento de 200 X, utilizando-se lâmina coberta por lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C. A análise da morfologia espermática foi realizada em microscópio de contraste de fase sob aumento de 1000

X. O volume testicular foi calculado de acordo com Fields et al. (1979) [23], sendo $\text{volume} = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$, em que, r = raio da largura testicular ($L/2$); π (Pi) = 3,1416 e h = comprimento testicular.

A coleta de sangue para realização do ritmo de secreção em 24 horas do AMH foram feitas nos meses de novembro e janeiro (porém as dosagens do AMH de janeiro ainda não foram feitas), por meio da punção da veia ou artéria coccígea. Realizou-se oito coletas num intervalo de 24 horas, intercaladas em 3 horas: 09:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 24:00, 03:00 e 06:00 horas, estabelecendo-se uma curva diária (ritmo circadiano). Nos meses de dezembro e fevereiro também coletou-se sangue para comparação da evolução da concentração de AMH durante todo o período de coleta, porém em um único momento do dia (essas dosagens também ainda não foram realizadas).

Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos, conforme Santos et al. (2000) [24]. O soro obtido foi identificado, acondicionado em microtubos tipo eppendorf e armazenado em freezer a -18°C para dosagem de AMH, por meio de kits comerciais.

Quantificou-se as concentrações séricas de AMH (ng/mL) através do método de ELISA, utilizando-se o *kit* comercial “Bovine AMH ELISA” (AnshLabs®, USA). As concentrações de T (ng/mL) foram obtidas utilizando-se o *kit* comercial “RIA Testosterone” (Immunotech®, USA), ambas realizadas no Instituto Genese de Análise Científica (São Paulo, Brasil). A sensibilidade do ensaio do AMH e da T foi de 0,011 ng/mL e 0,04 ng/mL, respectivamente e o coeficiente de variação intraensaio $<5\%$.

Inicialmente foram realizadas correlações entre as variáveis. Após verificação da normalidade das variáveis realizou-se transformações quando necessário. Adotou-se a análise de variância de duas vias para medidas repetidas, tendo idade e momento como variáveis independentes, através do GLIMMIX do SAS.

Resultados

Tabela 1. Médias e desvios padrão da Idade (meses), peso (kg) e medidas foliculares nos ovários direito e esquerdo (mm) de 6 novilhas Nelore, nos diferentes momentos de coleta (1 a 4).

Coletas	Avaliações			
	Idade (meses)	Peso (kg)	Fol D (mm)	Fol E (mm)
1	11,67 ± 0,33 ^d	222,67 ± 10,06 ^c	7,94 ± 2,20 ^a	3,36 ± 2,06 ^a
2	12,67 ± 0,33 ^c	243,17 ± 9,75 ^{b,c}	5,67 ± 1,83 ^a	7,28 ± 1,55 ^a
3	13,67 ± 0,33 ^b	262,67 ± 10,08 ^{a,b}	10,03 ± 3,70 ^a	5,98 ± 1,96 ^a
4	14,67 ± 0,33 ^a	281,50 ± 9,56 ^a	9,65 ± 1,17 ^a	4,49 ± 2,01 ^a

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa em nível de 5%, teste t de *Student*

O peso corporal dos machos ($R^2 = 76,7\%$, $CV=8,32$) variou em função da puberdade e do momento de coleta ($P<0,05$), já o PE ($R^2 = 73,23\%$, $CV= 7,02$) e o VOLtest ($R^2 = 68,73\%$, $CV= 30,61$) apresentaram variação significativa em função da puberdade (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrão dos aspectos clínicos reprodutivos e desempenho de 6 machos Nelore, de acordo com o momento de coleta (1 a 4)

	Coletas			
	1	2	3	4
Idade (meses)	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00
Peso (kg)	273,50 ± 20,22 ^c	298,60 ± 29,52 ^b	324,33 ± 31,59 ^b	381,50 ± 25,03 ^a
PE (cm)	22,91 ± 1,71 ^c	24,74 ± 2,44 ^b	26,00 ± 2,63 ^b	28,50 ± 2,21 ^a
Vol. Testicular (mm ³)	160,16 ± 62,52 ^c	254,16 ± 105,08 ^{b,c}	325,85 ± 134,94 ^{a,b}	404,52 ± 104,68 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5%, teste t de *Student*

Dos seis machos utilizados no experimento cinco atingiram a puberdade até a última coleta no mês de fevereiro de 2014. Quanto aos aspectos físicos do sêmen, analisados excluindo-se o primeiro momento, em que nenhum dos animais respondeu a coleta de sêmen, não se observou variação significativa em função do momento (Tabela 3).

Tabela 3. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen ($\pm$ desvio padrão) de seis touros jovens Nelore nos diferentes momentos de coleta (1 a 4)

	Coletas			
	1	2	3	4
Características Físicas				
Motilidade (%)	.	10,00 $\pm$ 0,00 ^a	20,00 $\pm$ 8,16 ^a	23,00 $\pm$ 11,66 ^a
Vigor (0-5)	.	1,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,66 $\pm$ 0,47 ^a	2,40 $\pm$ 0,80 ^a
Volume (ml)	.	1,50 $\pm$ 0,00 ^a	2,00 $\pm$ 0,70 ^a	2,50 $\pm$ 0,76 ^a
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	.	195,00 $\pm$ 0,00 ^a	81,00 $\pm$ 0,00 ^a	27,00 $\pm$ 6,16 ^a
Conc. Ejaculado (sptz total)	.	292,50 $\pm$ 0,00 ^a	149,25 $\pm$ 97,22 ^a	189,20 $\pm$ 250,2 ^a
Morfologia espermática				
GCP	.	35,00 $\pm$ 0,00 ^a	39,00 $\pm$ 10,98 ^a	29,60 $\pm$ 22,25 ^a
Defeitos Maiores	.	112,00 $\pm$ 0,00 ^a	55,00 $\pm$ 10,80 ^a	39,00 $\pm$ 25,80 ^a
Defeitos Menores	.	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,00 $\pm$ 0,81 ^a	1,00 $\pm$ 0,63 ^a
Defeitos Totais	.	90,00 $\pm$ 0,00 ^a	56,00 $\pm$ 10,20 ^a	40,00 $\pm$ 25,86 ^a
% Normais	.	10,00 $\pm$ 0,00 ^b	44,00 $\pm$ 10,19 ^a	60,00 $\pm$ 25,86 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5%, teste t de Student

Em relação a ritmicidade de secreção do AMH nas fêmeas e nos machos, os níveis séricos médios revelaram não haver diferença significativa ao longo do dia ($P > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

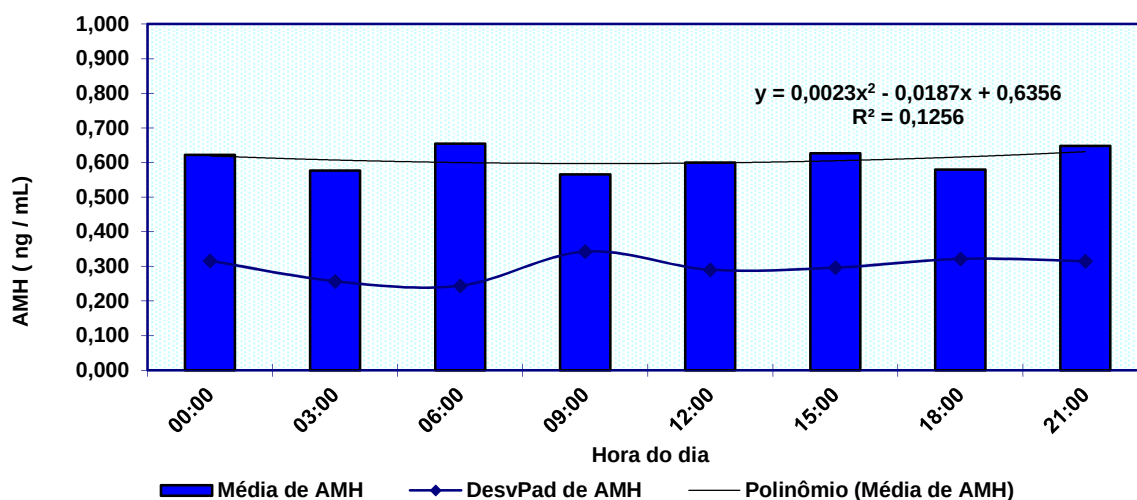


Figura 1. Perfil de secreção do AMH (ng/mL – média e desvio padrão), durante o período de 24 horas, do soro de 6 fêmeas Nelore entre 11 e 12 meses de idade.

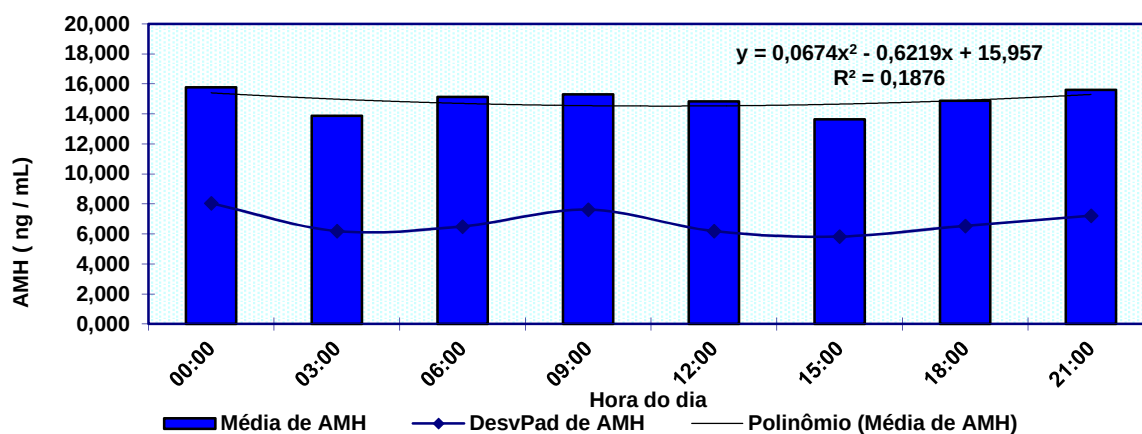


Figura 2. Perfil de secreção do AMH (ng/mL – média e desvio padrão), durante o período de 24 horas, do soro de 6 machos Nelore com 11 a 12 meses de idade.

O padrão de secreção individual de secreção em 24 horas do AMH, mostrou-se distinto para cada animal, macho e fêmea, utilizado no estudo (Figura 3 e 4).

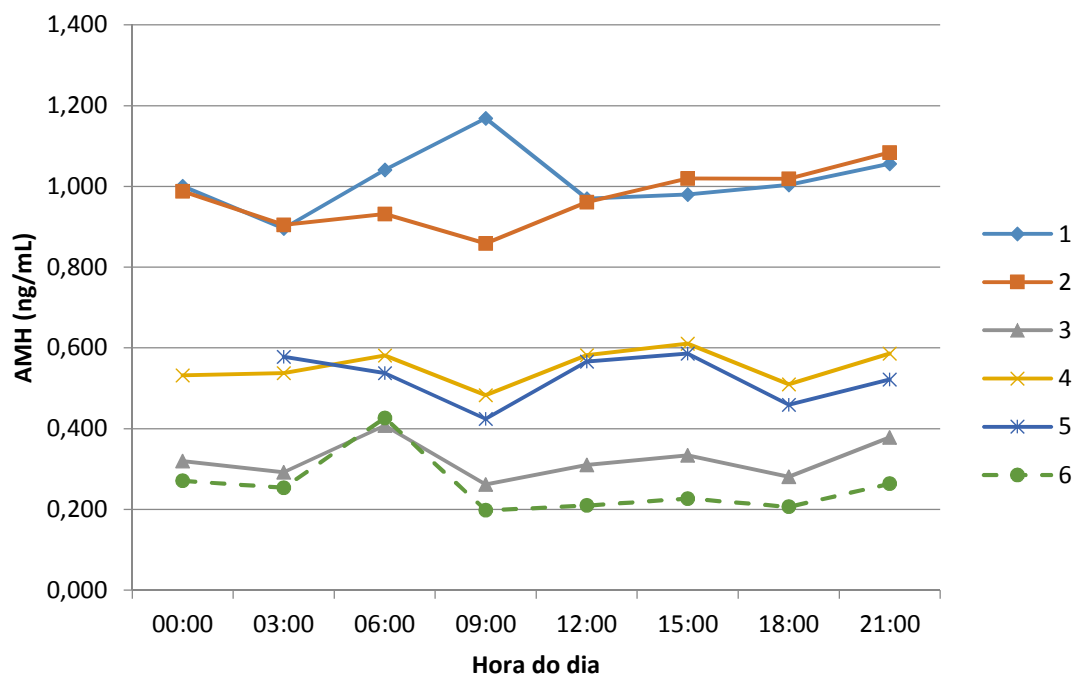


Figura 3. Perfil individual de secreção do AMH (ng/mL – média e desvio padrão), durante o período de 24 horas, do soro de 6 fêmeas Nelore com 11 a 12 meses de idade.

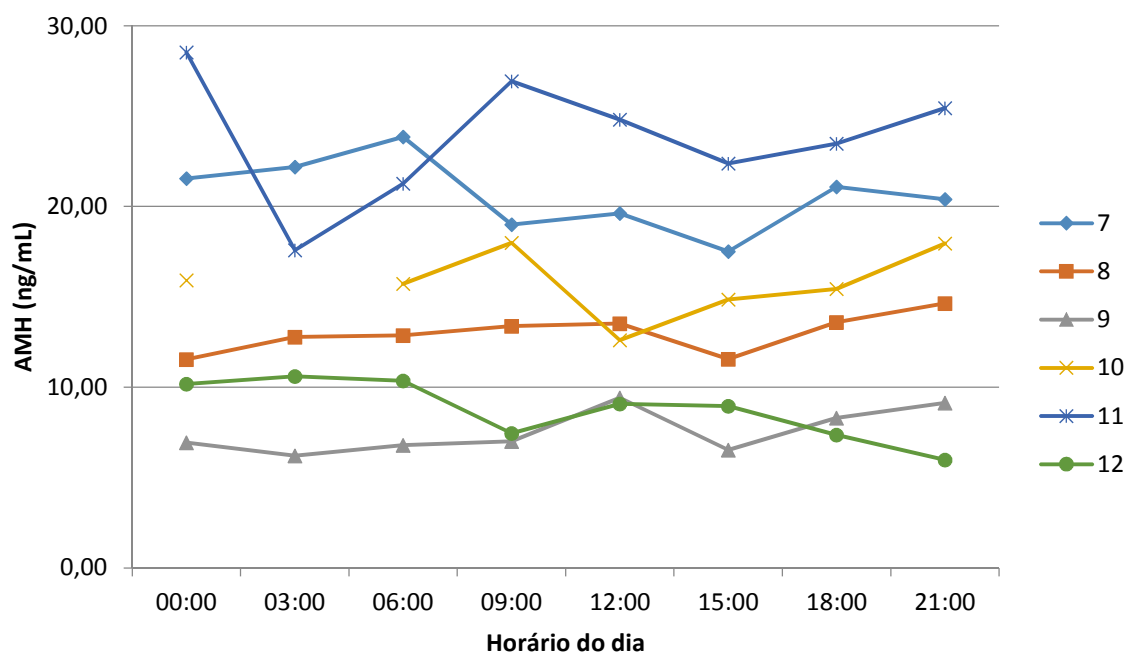


Figura 4. Perfil individual de secreção do AMH (ng/mL – média e desvio padrão), durante o período de 24 horas, do soro de 6 machos Nelore com 11 a 12 meses de idade.

Discussão

Os dados produtivos e reprodutivos obtidos no experimento mostram que todos os animais envolvidos, tiveram durante os quatro meses de coleta desenvolvimento ponderal e reprodutivo condizente com a idade e a raça, mostrando adaptabilidade ao meio e ao manejo em que são criados. Curvas de resposta alcançadas de várias espécies animais e vegetais mostram que fatores ambientais, tais como iluminação, temperatura e manejo têm efeito importante sobre a expressão dos ritmos endógenos, promovendo ajustes através de mecanismos biológicos específicos e dentro de limites bem definidos para cada espécie [25].

As fêmeas apresentaram ganho de peso a cada coleta subsequente, iniciando com média de $222,67 \pm 10,06$ kg e finalizando com $281,50 \pm 9,56$ kg. As novilhas apresentaram desenvolvimento reprodutivo compatível com a idade, permitindo a visualização de folículos na superfície ovariana e, inclusive, com três delas apresentando CL na última coleta, evidenciando ciclicidade estral (Tabela 1). Trabalhando com novilhas Nelore, De Lucia et al. (2002) [26] acompanharam a dinâmica folicular, dos oito aos 16 meses, observando que a taxa de crescimento folicular (mm/dia) permaneceu constante; no entanto, o folículo dominante apresentou maior diâmetro final com o decorrer da idade. Os mesmos autores, ainda verificaram que 32% das novilhas do estudo ficaram gestantes aos 15 meses, ou seja, já estavam

cíclicas com essa idade, o que também foi encontrado em no nosso experimento, no qual as novilhas Nelore mostraram-se cíclicas com idade próxima aos 15 meses.

Os machos iniciaram o experimento com $273,50 \pm 20,22$ kg em média e idade de 12 meses, alcançando aos 15 meses, $381,50 \pm 25,03$ kg (Tabela 2). O PE ao ano foi de $22,91 \pm 1,71$ cm, compatível com a idade, de acordo com o já registrado por CBRA (2013) [27] que sugere o PE médio para esta idade de 22,5 cm. Aos 15 meses o PE foi superior ($28,50 \pm 2,21$ cm) ao sugerido pelo CBRA (2013) [27] de 26,7 cm. A idade média à puberdade foi de 13,7 meses, corroborando os dados encontrados na literatura, que mostram a idade média da entrada na puberdade para machos Nelore, entre 10 a 16 meses [28,29,30,31,32].

Em relação ao volume testicular (Tabela 2), os tourinhos tiveram um aumento do volume testicular durante os quatro meses de coleta, iniciando com $160,16 \pm 62,52$ mm³ e finalizando com $404,52 \pm 104,68$ mm³. Dos seis animais do experimento cinco atingiram a puberdade até a última coleta, o que explica esse aumento significativo no volume testicular. Este dado pode ser explicado com o conhecimento de que, em bovinos pré-puberes, o GnRH estimula o aumento na pulsatilidade de LH da adenohipófise, que por sua vez, aumenta a secreção de T pelas células de Leydig [33,34]. Aplicações exógenas de GnRH em machos aumentam o peso testicular, PE e número de túbulos seminíferos em bezerros pré-puberes [35]. Outro estudo também mostrou o mesmo resultado, porém, correlacionando positivamente o aumento da T com as mesmas medidas em tourinhos *Bos taurus* [34].

O ritmo de secreção do AMH, tanto em fêmeas como em nos machos, não mostrou diferença significativa durante as 24 horas de coleta no mês de novembro (Figuras 1 e 2), porém há uma variação individual de secreção do hormônio (Figuras 3 e 4). Dados referentes à ritmicidade do AMH em homens, também mostram haver variação individual nas dosagens plasmáticas do hormônio, porém sem diferença dos níveis em momentos diferentes de coleta em um mesmo dia [36].

O AMH parece ter um ritmo de secreção com baixa frequência e baixa amplitude de seus pulsos em animais Nelore, diferente do que é descrito, por exemplo, para o GnRH, que possui duas formas de secreção, uma pulsátil com alta frequência e baixa amplitude, e a segunda de forma a ter picos de elevação em momentos específicos, como é o caso do pico pré-ovulatório [37].

Os resultados encontrados no experimento mostram que o AMH, em bovinos Nelore, não apresenta um ritmo circadiano, tendo um ritmo de secreção com baixa frequência

e baixa amplitude, permitindo a coleta de sangue para dosagem hormonal em qualquer momento do dia.

Agradecimentos

A Fazenda Arizona pelo apoio na pesquisa e a Fundect pela concessão de bolsa de Doutorado e apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa.

Referências

- [1] Josso N, di Clemente N. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14(2):91-7.
- [2] Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79(3):415-25.
- [3] Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996; 10(20):2577-87.
- [4] Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211(1-2):21-31.
- [5] Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews* 1993; 14(2):152-64. DOI: 10.1210/edrv-14-2-152.
- [6] Josso N, di Clemente N. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14(2): 91-7.
- [7] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JÁ, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143(3):1076-84. DOI: 10.1210/endo.143.3.8691.
- [8] Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10(2):77-83.
- [9] Thomas FH; Telfer, Evelyn E; Fraser, HM. Expression of anti-Mullerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2007; 148(5):2273-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1501>.
- [10] Campbell BK, Clinton M, Webb R. The role of anti-Mullerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology* 2012; 153(9):4533-43.
- [11] Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91(10): 4064-9. DOI: 10.1210/jc.2006-1066.
- [12] Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the

- preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92(5):1796-802. DOI: 10.1210/jc.2006-1053.
- [13] Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2008; 89(3):586-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.080>.
 - [14] Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertility and Sterility* 2005; 83(4):979-87. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.029.
 - [15] Gruijters MJG, Visser JA, Durlinger Alexandra LL, Themmen A. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211(1-2):85-90. DOI: 10.1016/j.mce.2003.09.024.
 - [16] Fénichel P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevallier D, Pointis G. Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14(8):2020-4.
 - [17] Mostafa T, Amer MK, Abdel-Malak G, Nsser TA, Zohdy W, Ashour S, El-Gayar D, Awad HH. Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE). *Asian J Androl* 2007; 9(2):265-70. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2007.00252.x.
 - [18] Banco B, Veronesi MC, Giudice C, Rota A, Grieco V. Immunohistochemical evaluation of the expression of anti-Müllerian hormone in mature, immature and neoplastic canine Sertoli cells. *Journal of Comparative Pathology* 2012; 146(1):18-23. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.03.011.
 - [19] Rey RA, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5):1220-6. DOI: 10.1210/jcem.77.5.8077315.
 - [20] Okay TS. Hormônio anti-mülleriano: importância na prática pediátrica. *Rev Assoc Med Brasileira* 2003; 49(1):16-7.
 - [21] Queiroz, VLD. Hormônio anti-Mulleriano e puberdade em machos Nelore. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia, Universidade federal de mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.
 - [22] Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Prepuberal behaviour and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J Anim Sci* 1965; 224:761-5. DOI: doi:10.2527/jas1965.243761x.
 - [23] Fields MJ, Burn WC, Warnick AC. Age, season and effect on testicular volume and semen traits in young bulls. *J Anim Sci* 1979; 48:1299-1304.
 - [24] Santos MD, Torres CAA, Ruas JRM, Machado GV, Costa DS, Angulo LM. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000; 29(3):738-44. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000300015>.
 - [25] Rotenberg, L, Marques, N, Menna-Barreto, L. Desenvolvimento da Cronobiologia. In: Marques, N, Menna-Barreto, LS. (Orgs.). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo: EDUSP. 1997. 23-44.
 - [26] De Lucia RFS, Pereira FV, Nogueira GP. Follicular population in precocious and non precocious Nelore heifers during prepubertal period. *Theriogenology* 2002; 57: 603.
 - [27] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para Exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

- [28] Cardoso FM. Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebus (*Bos indicus*), da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade. 1977. 113f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.
- [29] Castro VM, Vale Filho VR, Reis SR, Oliveira HN. Puberdade e início de maturação sexual em touros Nelore, de 10-14 meses de idade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1989, 1:183.
- [30] Castro VM, Vale Filho VR, Reis SR, Oliveira HN. Circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos de touros Nelore, de 10 aos 24 meses de idade, criados a pasto, na região de Montes Claros- MG. In: CONGRESSO MINEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4, Belo Horizonte, 1990, p. 18-19.
- [31] Unanian MM. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In: O NELORE DO SÉCULO XXI, 4, 1997, Uberaba, Anais... Uberaba: ABCZ, 1997, p. 51-57.
- [32] Costa e Silva EV, Costa Filho LCC, Souza CC, Oliveira CC, Queiroz VLD, Zuccari CESN. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. *Ver. Bras. de Rep. Animal* 2015, 39(1):22-31.
- [33] Bergmann JAG. Seleção de Zebuínos para Precocidade Sexual. SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE 1999, 1, Viçosa, Anais... Viçosa: Ed. Suprema, 51-59
- [34] Kitahara G, Kamata R, Sasaki Y, El-Sheikh Ali H, Mido S, Kobayashi I, Hemmi K, Osawa T. Change in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. *Domestic Animal Endocrinology* 2016;57:127-132.
- [35] Brito LFC. Endocrine control of testicular development and initiation of spermatogenesis in bulls. In: Hopper RM, editor. *Bovine reproduction*. 1st edition. Iowa, USA: John Wiley & Sons Inc; 2015, 30–8.
- [36] Aksglaede L, Sorensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, Petersen JH, Linneberg A, Andersson A-M, Main KM, Skakkebaek NE, Juul A. Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(12):5357-64. DOI: 10.1210/jc.2010-1207.
- [37] Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior* 2004; 81(2):289-317.

Avaliação comparativa do hormônio Anti-Mülleriano à desmama da progênie masculina Nelore de acordo com a precocidade sexual paterna

Comparative evaluation at weaning of Anti-Müllerian hormones of male progeny Nelore according to paternal sexual precocity

Resumo: A pediatria já utiliza o hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como parâmetro clínico na identificação de problemas de precocidade sexual, puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e tardia (altas concentrações de AMH). O objetivo do presente trabalho foi verificar a correlação das concentrações do AMH em bezerros à desmama com a precocidade sexual dos pais e comparar os níveis de AMH com a precocidade paterna. Utilizou-se 61 machos Nelore, filhos de 7 touros já identificados anteriormente quanto a sua precocidade, com média de 8,7 animais por progênie (5 – 17 filhos/pai). Os bezerros foram classificados quanto à precocidade sexual como: superprecoces (SP) - animais que apresentaram idade à puberdade até 52 semanas de idade; precoce (P) - aqueles que atingiram a puberdade entre 53 e 64 semanas de idade; e tardio (Td) - aqueles que alcançaram a puberdade a partir de 65 semanas. Destes, coletou-se o sangue em três momentos (desmama, 12 e 16 meses), para quantificação do AMH e testosterona (T). Os estudos de correlação mostraram que a precocidade dos pais não se correlacionou com a precocidade sexual de seus filhos e que houve uma correlação positiva entre a precocidade dos bezerros e a idade em que foram desmamados, ou seja, animais nascidos no final da estação de parição apresentavam-se púberes mais precocemente. À puberdade, os machos SP, apesar de mais jovens e apresentarem peso e PE menores, não diferiram dos P e Td quanto aos níveis hormonais de AMH e T. Os animais filhos de pais SP apresentaram idade à desmama menor, mas não diferiram dos P. Quanto aos níveis hormonais, filhos de pais SP e P não diferiram entre si. Não foi encontrada correlação da concentração do AMH com nenhuma das características estudadas.

Palavras-chave: AMH, puberdade, touros

Abstract: Pediatrics already uses the Anti-Müllerian Hormone (AMH) as a clinical parameter for identification of sexual precocity, early puberty (low concentrations of AMH) and delayed puberty (high concentrations of AMH). The objective of the present study was to verify the correlation between AMH concentrations in calves at weaning and the sexual precocity of the parents and, additionally, compare AMH levels with paternal precocity. A total of 61 Nelore males, sons of 7 precocious bulls were used, with the average of 8.7 animals per progeny (5-17 children/parent). The calves were classified as: super precocious (SP) - animals that presented age at puberty up to 52 weeks of age; precocious (P) - those who reached puberty between 53 and 64 weeks of age; and late (Td) - those who reached puberty after 65 weeks. Blood was collected three times (weaning, 12 and 16 months) to quantify AMH and testosterone (T). The correlation studies showed that the precocity of the parents did not correlate to sexual precocity of their children and that there was a positive correlation between the precocity of calves and the age at which they were weaned, that is, animals born at the end of the calving season presented puberty earlier. At puberty, SP males, although younger and with lower weight and escrotal perimeter, did not differ from P and TD regarding AMH and T levels. Animals children of SP parents had lower wean age, but did not differ from P. Concerning the hormonal levels, children of parents SP

and P did not differ among themselves. No correlation was found between AMH concentration and the characteristics studied.

Keywords: AMH, bulls, puberty

Introdução

A puberdade é o período em que se verifica um rápido desenvolvimento reprodutivo e somático [1]. Ela inicia-se com o aparecimento da fertilidade em seus aspectos funcional, fisiológico e comportamental. Estes eventos não ocorrem simultaneamente e, por isso, para caracterizar o início da puberdade, utiliza-se uma combinação de diversos parâmetros [2]. Este fato está diretamente relacionado a fatores genéticos, condições nutricionais pré-desmama e pós-desmama, manejo e, até mesmo, a linhagem dentro da raça [3], o que torna a cronologia deste evento bem diferenciada entre as raças bovinas [4].

Idade à puberdade é um fator essencial na eficiência reprodutiva em sistemas de produção de bovinos de corte. Bovinos *Bos indicus* são tipicamente mais tardios sexualmente em relação ao gado *Bos taurus* [5]. Dado o crescente interesse no gado zebuino devido à sua melhor adaptação ao ambiente tropical, a determinação da puberdade é de extrema importância no sentido de identificar animais mais precoces sexualmente. Esta característica possui média herdabilidade, o que faz com que seja o foco principal de utilização nos programas de melhoramento genético no país.

Recentemente, aos critérios já conhecidos para seleção da precocidade sexual, têm-se tentado agregar diversos outros recursos, tais como ultrassonografia testicular, métodos de avaliação da integridade e eficiência biológica da célula espermática e identificação de marcadores biológicos para eficiência reprodutiva [6].

Um método promissor é a quantificação do hormônio AMH, que poderá atuar como um biomarcador para uma possível detecção da puberdade precoce em touros. O AMH é secretado pelas células de Sertoli e, estas, estão entre as primeiras células a se diferenciarem nas gônadas fetais do macho, e promovem a secreção deste hormônio responsável pela regressão dos ductos de Müller [7,8,9].

Em humanos, a pediatria já utiliza o AMH como parâmetro clínico na identificação de problemas de precocidade sexual, puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e tardia (altas concentrações de AMH) [10,11].

Em equinos foi observada a redução das concentrações de AMH de acordo com o desenvolvimento do animal até a fase adulta. As concentrações desse hormônio eram altas no potros imaturos, e muito baixas ou ausentes em garanhões adultos [12].

Em bovinos Nelore, a concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada, comportamento esse inverso ao da testosterona (T). Nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, quando os níveis de AMH são reduzidos e os da T se elevam, resultados esses que demonstram que o AMH revela-se como um possível marcador biológico de precocidade sexual em machos bovinos [13].

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a correlação das concentrações do AMH em bezerros à desmama com a precocidade sexual dos pais.

Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo a manipulação dos animais durante a fase experimental aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo nº 511/2013.

Utilizou-se dados de 61 machos Nelore, de 7 a 8 meses, filhos de sete touros previamente identificados anteriormente, quanto a sua classe de precocidade sexual. Os touros possuíam em média 8,7 filhos por progênie (5 – 17 filhos/touro), e pertencem a uma propriedade que realiza seleção para precocidade sexual, no município de Rio Brilhante, Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 21°45'15" S, longitude 54° 25'50" W), além de utilizar como base de seleção a mais de duas décadas o programa de melhoramento genético Nelore Brasil (ANCP). A desmama da propriedade é realizada em um único momento, no mês de julho, quando todos os bezerros da safra são separados das mães ao mesmo tempo, independentemente da idade, que pode variar de 5,5 meses a 9 meses de idade.

Os bezerros não receberam nenhum tipo de suplementação, além de sal mineralizado, até o momento da desmama. Após a desmama os animais receberam suplementação de concentrado (18% PB) diariamente, em uma relação concentrado/peso vivo de 1%.

Os animais foram submetidos à pesagem e mensuração do perímetro escrotal (PE) e à coleta sanguínea para quantificar o nível sérico de AMH e T ao desmame, aos 12 e

aos 16 meses. Todos os animais experimentais mantiveram-se em um mesmo sistema de criação e manejo.

Os touros pais e os bezerros tiveram sua classificação quanto à precocidades sexual como: superprecoces (SP) - animais que apresentaram idade à puberdade até 52 semanas de idade; precoces (P) - aqueles que atingiram a puberdade entre 53 e 64 semanas de idade; e tardios (Td) - aqueles que alcançaram a puberdade a partir de 65 semanas de idade.

Aos 12 e aos 16 meses os animais foram submetidos também à eletroejaculação para obtenção do sêmen. Os procedimentos de coleta e análise de sêmen seguiram o proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) [14]. Os tourinhos que após a coleta de sêmen atingiram a concentração espermática total do ejaculado de no mínimo 50×10^6 e motilidade $\geq 10\%$ foram considerados púberes, classificação definida por Wolf et al. (1965) [15]. A motilidade progressiva, o vigor e a concentração espermática foram estimados em microscopia óptica de campo claro, sob aumento de 200 X, utilizando-se lâmina coberta por lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C.

As coletas sanguíneas deram-se pela punção da veia ou artéria coccígea. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos, conforme Santos et al. (2000) [16]. Identificou-se o soro obtido, acondicionado em microtubos tipo eppendorf e armazenado em freezer a -18°C para dosagem de AMH, por meio de kits comerciais.

Quantificou-se as concentrações séricas de AMH (ng/mL) através do método de ELISA, utilizando-se o kit comercial “Bovine AMH ELISA” (AnshLabs®, USA). As concentrações de T (ng/mL) foram obtidas utilizando-se o kit comercial “RIA Testosterone” (Immunotech®, USA), ambas realizadas no Instituto Gênese de Análise Científica (São Paulo, Brasil). A sensibilidade do ensaio do AMH e da T foi de 0,011 ng/mL e 0,04 ng/mL, respectivamente e o coeficiente de variação intraensaio $<5\%$.

Inicialmente, estabeleceram-se as correlações entre as variáveis, por meio da Correlação de Spearman. As variáveis foram submetidas à análise de variância considerando o efeito fixo de precocidade sexual paterna (PRECpai) e do animal (PRECbez) e a interação PRECpai*PRECbez, por meio do procedimento GLM do SAS (2002). Posteriormente, verificou-se o efeito da precocidade sexual paterna sobre a idade à puberdade, considerando-se ainda os efeitos fixos dos níveis séricos de AMH e T, peso, perímetro escrotal à desmama e à puberdade e idade à desmama,

avaliados em modelo de regressão processada por *stepwise*, utilizando-se o Programa SAS.

Resultados

Os bezerros foram desmamados, na média, com $41,31 \pm 2,71$ semanas de idade (9 meses), peso médio de $271,95 \pm 35,35$ kg, PE médio de $20,59 \pm 1,65$ cm. Os níveis séricos de AMH e T, nesta fase, estavam em $16,14 \pm 1,47$ ng/mL e $2,78 \pm 2,14$ ng/mL, respectivamente. Registrou-se idade média dos animais à puberdade de $60,26 \pm 6,92$ semanas (14 meses), peso vivo médio de $367,53 \pm 6,47$ kg, com PE de $29,29 \pm 0,39$ cm, apresentando níveis séricos de $8,42 \pm 3,42$ ng/mL e $9,24 \pm 6,93$ de AMH e T, respectivamente.

Os estudos de correlação mostraram que a precocidade dos pais não se correlacionou com a precocidade sexual de seus filhos e que houve uma correlação positiva entre a precocidade dos bezerros e a idade em que foram desmamados, ou seja, animais nascidos no final da estação de parição apresentavam-se púberes mais precocemente.

Quanto à análise de variância, o modelo testado foi significativo para peso à desmama ($P=0,0030$, $CV=11,29$, $R^2=0,3456$) apresentando variação significativa em função da PrecP, $P=0,0004$. PE à desmama ($P=0,0050$, $CV=7,06$, $R^2=0,33297$) variou significativamente em função da PrecP, $P=0,0007$. Quanto à T ($P=0,0250$, $CV=67,83$, $R^2=0,3195$), observou-se efeito significativo da PrecP, $P=0,0109$, e interação PrecP*PrecB, $P=0,0209$. O peso à puberdade ($P=0,0001$, $C=-9,93$, $E^2=0,5421$) variou significativamente em função da PrecB ($P=0,0001$), da PrecP ($P=0,0398$) e a interação PrecP*PrecB apresentou $P=0,0764$. PE à puberdade ($P=0,0001$, $CV=7,66$, $R^2=0,5152$) variou significativamente em função da PrecB ($P=0,0131$), da PrecP ($P=0,0488$) e da interação PrecP*PrecB ($P=0,0012$).

Observa-se que os animais SP foram desmamados mais cedo, mas não diferiram quanto aos níveis hormonais ou quanto ao peso à desmama. Já no PE, esta categoria apresentou, uma medida intermediária em relação aos animais P e Td (Tabela 2).

À puberdade, os machos SP, apesar de mais jovens e apresentarem peso e PE menores, não diferiram dos P e Td quanto aos níveis hormonais de AMH e T.

Os animais filhos de pais SP apresentaram idade à desmama menor, mas não diferiram dos P. Quanto aos níveis hormonais, filhos de pais SP e P não diferiram entre si, mas infelizmente ainda não foi possível processar o material dos animais tardios. À puberdade, os filhos de animais de diferente expressão de precocidade

sexual diferiram entre si apenas quanto ao peso à puberdade, em que os pais P apresentaram progênie mais pesada à puberdade que os pais Td (Tabela 3).

A análise de regressão mostrou uma tendência linear significativa da expressão da idade à puberdade em função da idade à desmama e do peso a puberdade ($P=0,0002$, $R^2=0,7220$, $CV=5,33$; Figura 1). Não se observou efeito significativo das variáveis hormonais (AMH e T), do PE à desmama ou à puberdade, muito menos da classe de precocidade sexual do pai sobre a precocidade sexual expressa pela idade à puberdade ou pela classe de precocidade sexual dos filhos.

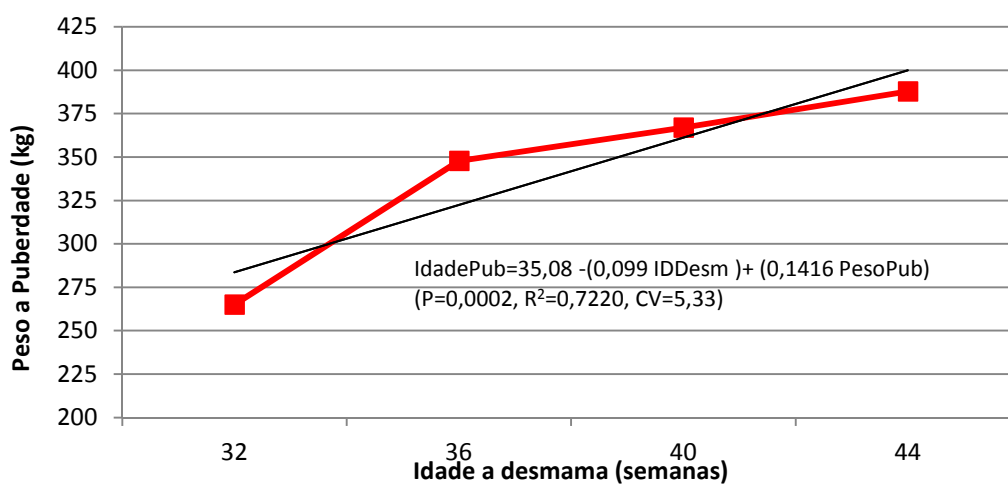


Figura 1. Análise de regressão linear da idade a puberdade em função da idade à desmama e do peso a puberdade de bezerros Nelore.

Tabela 1. Correlações entre características físicas e reprodutivas com a classe de precocidade sexual do animal (PrecBez) e do pai (PrecPai).

	PrecBez	PrecPai
PrecBez	-	-0.0997
		<i>ns</i>
IdDesm	0.4055	-0.0974
	0.0012	<i>ns</i>
IdPub	0.9077	0.0436
	<.0001	<i>ns</i>
IdPubPAI	0,0125	0,9205
	<i>ns</i>	0,0001
PesoDesm	-0,0738	-0.0883
	<i>ns</i>	<i>ns</i>
PesoPub	0.6104	-0.1106
	<.0001	<i>ns</i>
AMHdesm	0.2817	-0.2311
	<i>ns</i>	<i>ns</i>
AMHpub	-0.2680	-0.1158
	0.0419	<i>ns</i>
Testdesm	0.0821	0.2858
	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Testpub	-0.3590	-0.2179
	<i>ns</i>	<i>ns</i>
PEdesm	-0.0847	-0.0703
	<i>ns</i>	<i>ns</i>
PEpub	0.4331	-0.0275
	0.0005	<i>ns</i>

IdDesm – idade à desmama em semanas; IdPub - idade à puberdade em semanas; PesoDesm – peso à desmama; PesoPub; AMHdesm – Hormônio anti-mülleriano à desmama; AMHpub - Hormônio anti-mülleriano à puberdade ; Testdesm – Testosterona à desmama; Testpub – Testosterona à puberdade; PEdesm – perímetro escrotal à desmama; PEpub - perímetro escrotal à puberdade.

Tabela 2. Médias ($\pm$ desvio padrão) dos aspectos clínicos andrológicos e níveis séricos de hormônio Anti-Mülleriano (AMH) e de Testosterona (T), de acordo com a classe de precocidade sexual à desmama e à puberdade de bezerros Nelore.

Precocidade sexual do Bezerro			
Variáveis à desmama	SP	P	Td
Idade desm (sem)	39,43 $\pm$ 0,71 ^a	41,39 $\pm$ 0,54 ^b	42,43 $\pm$ 0,48 ^b
AMH desm (ng/mL)	15,90 $\pm$ 0,42 ^a	15,82 $\pm$ 0,43 ^a	16,59 $\pm$ 0,44 ^a
T desm (ng/mL)	2,46 $\pm$ 0,49 ^a	2,51 $\pm$ 0,52 ^a	3,31 $\pm$ 0,82 ^a
PE desm (cm)	20,61 $\pm$ 0,41 ^b	20,78 $\pm$ 0,30 ^a	20,40 $\pm$ 0,40 ^c
Peso desm (kg)	265,36 $\pm$ 8,49 ^a	273,61 $\pm$ 6,95 ^a	274,21 $\pm$ 8,15 ^a
Variáveis à puberdade	SP	P	Td
Idade pub (sem)	50,86 $\pm$ 0,65 ^a	59,65 $\pm$ 0,87 ^b	66,86 $\pm$ 0,38 ^c
AMH pub (ng/mL)	9,62 $\pm$ 1,17 ^a	8,64 $\pm$ 0,56 ^a	7,45 $\pm$ 0,71 ^a
T pub (ng/mL)	10,81 $\pm$ 2,65 ^a	8,49 $\pm$ 2,22 ^a	5,59 $\pm$ 0,22 ^a
PE pub (cm)	26,46 $\pm$ 0,89 ^c	29,39 $\pm$ 0,49 ^b	30,73 $\pm$ 0,48 ^a
Peso pub (kg)	311,31 $\pm$ 10,26 ^c	368,48 $\pm$ 8,00 ^b	397,08 $\pm$ 8,24 ^a
Mot. Progressiva (%)	46,43 $\pm$ 4,64 ^a	29,13 $\pm$ 3,82 ^b	17,39 $\pm$ 2,20 ^c
Conc. TT (nx10 ⁶ sptz/ejac)	303,82 $\pm$ 55,19 ^a	182,57 $\pm$ 45,80 ^a	80,60 $\pm$ 16,95 ^b

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) para teste t de *Student*.

SP - superprecoces; P - precoce; Td - tardios; Idade desm (sem) – idade a desmama em semanas; desm – desmama; pub – puberdade; AMH – concentração de AMH em ng/mL; T – concentração de Testosterona em ng/mL; PE- perímetro escrotal; Mot. Progressiva – motilidade progressiva; Conc. TT – concentração espermática.

Tabela 3. Médias ($\pm$ desvio padrão) dos aspectos clínicos andrológicos e níveis séricos de hormônio Anti-Mülleriano (AMH) e de Testosterona (T), de acordo com a classe de precocidade sexual dos pais de bezerros Nelore à desmama e à puberdade.

Precocidade sexual paterna			
Variáveis à desmama	SP	P	Td
Idade desm (sem)	41,21 $\pm$ 0,43 ^{a,b}	42,46 $\pm$ 0,56 ^a	39,20 $\pm$ 0,80 ^b
AMH desm (ng/mL)	16,26 $\pm$ 0,25 ^a	15,40 $\pm$ 0,94 ^a	-
T desm (ng/mL)	2,46 $\pm$ 0,35 ^a	4,61 $\pm$ 1,35 ^b	-
PE desm (cm)	20,56 $\pm$ 0,22 ^b	21,62 $\pm$ 0,43 ^a	18,20 $\pm$ 0,34 ^c
Peso desm (kg)	271,63 $\pm$ 4,17 ^b	294,31 $\pm$ 11,58 ^a	216,60 $\pm$ 6,10 ^c
Variáveis à puberdade	SP	P	Td
Idade pub (sem)	60,28 $\pm$ 1,08 ^a	60,92 $\pm$ 1,93 ^a	60,80 $\pm$ 2,33 ^a
AMH pub (ng/mL)	8,52 $\pm$ 0,6 ^a	8,31 $\pm$ 0,57 ^a	7,94 $\pm$ 1,43 ^a
T pub (ng/mL)	8,65 $\pm$ 1,80 ^a	11,02 $\pm$ 3,23 ^a	-
PE pub (cm)	29,07 $\pm$ 0,45 ^a	30,27 $\pm$ 0,96 ^a	28,60 $\pm$ 1,13 ^a
Peso pub (kg)	365,85 $\pm$ 6,98 ^{a,b}	383,69 $\pm$ 16,27 ^a	339,70 $\pm$ 28,20 ^b
Mot. Progressiva (%)	28,10 $\pm$ 2,98 ^c	29,23 $\pm$ 4,86 ^b	32,00 $\pm$ 10,20 ^a
Conc. TT (nx10 ⁶ sptz/ejac)	180,39 $\pm$ 30,59 ^a	165,98 $\pm$ 56,71 ^a	133,95 $\pm$ 75,52 ^a

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) para teste t de *Student*.

SP - superprecoces; P - precoce; Td - tardios; Idade desm (sem) – idade a desmama em semanas; desm – desmama; pub – puberdade; AMH – concentração de AMH em ng/mL; T – concentração de Testosterona em ng/mL; PE- perímetro escrotal; Mot. Progressiva – motilidade progressiva; Conc. TT – concentração espermática.

Discussão

Os bezerros utilizados no experimento apresentaram na média 271 $\pm$ 35,35 kg à desmama, peso bem superior ao encontrado na literatura para raça no mesmo período. Alencar et al. (1998) [18] desmamaram bezerros Nelore com pesos que variaram de 174,77 a 184,13 kg. Guimarães et al. (2011) [19] destacam que propriedades que de alguma forma utilizam programas de melhoramento genético, onde são utilizados animais considerados superiores na reprodução, apresentam um rebanho com desempenho também superior, como é o caso da fazenda a que pertencem os animais deste experimento.

O peso aos 12 meses dos animais do estudo também foi superior ao da referencia se considerarmos apenas os animais SP, por exemplo, que pesavam 311,31 $\pm$ 10,26 kg aos 12 meses, e foram os mais leves. Lira et al. (2013a) [20] trabalharam com bezerros Nelore no estado do Mato Grosso e os animais pesaram 244,22 kg na média com 12

meses de idade. Outros experimentos também tiveram média de peso inferior ao encontrado no estudo [21,22].

No desmame o PE médio no momento do desmame observado nos 61 tourinhos foi de $20,59 \pm 1,65$ cm, superior ao descrito pelo CBRA (2013) [15], que define o PE aos 9 meses, na média, para bovinos Nelore, em 18 cm. No momento em que os animais atingiram a puberdade, independente da classe de precocidade, todos estavam acima dos valores descritos pelo CBRA (2013) [15] para raça Nelore.

O PE médio dos animais à puberdade foi de $29,29 \pm 0,39$ cm. Queiroz (2014) [13], também trabalhando com tourinhos Nelore, encontrou medida de PE, para os animais púberes, muito próxima ao encontrado em nosso experimento ($28,29 \pm 0,45$ cm).

Referente às classes de precocidades, os animais classificados com Td necessitaram de uma maior medida, de PE ($30,73 \pm 0,48$ cm) para atingirem a puberdade em relação aos P ($29,39 \pm 0,49$ cm), os quais também mostraram maior PE que os SP ($26,46 \pm 0,89$ cm). Esse dado mostra que a medida do PE não pode ser uma única ferramenta para definir a puberdade, pois cada classe deste trabalho apresentou medidas distintas. A medida do PE não influenciou significativamente a expressão da idade à puberdade dos tourinhos.

Pesquisas brasileiras mostram que bovinos da raça Nelore atingem a puberdade entre 10 e 16 meses, coincidindo com o período de grande ganho de peso associado ao rápido crescimento testicular, aumento da secreção de LH e início da espermatogênese [23,24,25,26,27]. Os animais deste experimento na sua grande maioria, entraram na puberdade na idade descrita na literatura, sendo que os SP entraram na puberdade com menos de 12 meses, os P com pouco mais de 13 meses e os Td com cerca de 15 meses na média.

Outro trabalho com bovinos *Bos indicus*, porém na raça Guzerá, definiu a idade à puberdade dos tourinhos por volta dos 16 a 18,9 meses de idade com PE apresentando medida de 23 a 25,5 cm, utilizando 207 machos, dos quais 69% atingiram a puberdade com essas características [28], evidenciando que os animais do nosso experimento são mais precoces, na sua grande maioria que os estudados da raça Guzerá.

Não foi identificada diferença significativa para as variáveis hormonais (AMH e T), porém, os tourinhos SP apresentaram uma inversão das concentrações hormonais no momento da puberdade, pois a concentração da T já estava mais alta que a do AMH, o que não foi identificado nos tourinhos P e Td, em que o AMH ainda era mais alto que a T. Estes dados diferem dos relatados por Queiroz (2014) [13], também com

animais Nelore, que revelou que o AMH é um possível biomarcador de precocidade sexual em machos bovinos, considerando-se que o declínio nas concentrações séricas deste correlacionou-se à precocidade sexual, principalmente na distinção dos animais superprecoces dos animais tardios.

O declínio na concentração do AMH, nos tourinhos SP, no momento da puberdade está de acordo com o descrito por Rey et al. (2003) [9], que descreveram o mesmo comportamento hormonal em crianças com puberdade precoce, diferindo daquelas que atingiram a puberdade tardiamente e demonstraram valores superiores de AMH. Na espécie equina esse padrão de diminuição na concentração de AMH também ocorre, pois já foi descrito que garanhões têm menor concentração de AMH, quando comparados aos potros pré-puberes [12].

Para suínos os resultados evidenciam a mesma resposta para expressão do AMH na imunohistoquímica, pois foi detectado em células de Sertoli de suínos com dois meses de idade, desaparecendo completamente a partir dos seis meses de idade [29].

Na fase adulta de humanos, sugere-se que ocorra uma regulação antagônica entre AMH e T, sendo que a T parece exercer um efeito supressor sobre a secreção do AMH pelas células de Sertoli. Nestes momentos, os receptores de andrógeno (RA) já estão expressos na células de Sertoli e a T encontra-se em alta concentração intratesticular. Assim, a T atua nos RA, através da ação parácrina, inibindo a secreção do AMH pelas células de Sertoli [9,30]. Se esse comportamento hormonal se repetir em bovinos, pode explicar o que aconteceu com o AMH e a T nos animais SP; porém, não ocorreu o mesmo com os P e Td, que talvez ainda estivessem na fase de inversão de concentração do AMH e da T no momento da coleta sanguínea.

No nosso experimento não foram testadas variáveis referentes a metabolização hormonal dos tourinhos, porém, pode ser uma das explicação para que apenas os SP, no momento da puberdade, já estejam com os níveis de AMH mais baixo e os níveis de T mais altos. Essa hipótese ainda precisa ser elucidada.

A classe de precocidade dos pais não influenciou a classe de precocidade dos filhos, ou seja, pais SP não geraram, necessariamente filhos SP. As dosagens hormonais dos filhos de pais das diferentes classes de precocidade também não influenciaram a classificação dos tourinhos de acordo com sua precocidade. A única influência encontrada no trabalho foi que pais Td geraram filhos mais tardiamente na estação de monta, portanto os bezerros filhos dos pais Td desmamaram mais novos, com menor peso e menor PE à desmama e, conseqüentemente, à puberdade.

Relatos em bovinos machos levando em consideração a correlação pai-filho e a concentração de AMH, não foram encontrados, porém, para fêmeas, já existem alguns trabalhos mostrando uma correlação do AMH circulante entre mãe e filha. No entanto, as correlações são muito baixas, necessitando de mais estudos com maior número de animais [31]. Outros autores sugerem que fatores epigenéticos, tais como níveis de balanço energético negativo na vida fetal [32], idade da mãe e status lactacional [33] provavelmente influenciam os resultados estudados comparando-se mãe e filha. Outro fato que nossos resultados levam-nos a pensar é em uma influência da programação fetal, nas condições maternas da gestação, esse conceito é definido por estímulo ou insulto maternal no período do desenvolvimento fetal e tem longo impacto nas crias [34]. As mães dos tourinhos do nosso experimento podem pertencer a diferentes categorias, desde primíparas a pluríparas, além, da idade do parto dessas mães, pois muitas matrizes do rebanho utilizados parem antes dos 24 meses, o que pode ter impacto direto nas crias.

No nosso trabalho não levamos em consideração a linhagem materna, nem mesmo a informação de precocidade dessas vacas, fato que talvez possa influenciar de forma direta a precocidade sexual dos bezerros, haja visto que metade da carga genética dos tourinhos foi passada pelas mães, necessitando de novas pesquisas para possível identificação dessa influência.

Não foi encontrada correlação da concentração do AMH com nenhuma das características estudadas. Não foi possível identificar correlação entre a classe de precocidade do pai em relação aos bezerros.

Agradecimentos

Ao grupo Genética Aditiva pelo apoio na pesquisa e a Fundect pela concessão de bolsa de Doutorado e ajuda financeira para pesquisa.

Referências

- [1] Freneau GE. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir desde os seis até os 21 meses de idade (Puberdade e pós-puberdade). 1991, 194p. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 1991.
- [2] Freneau GE. Biopsia testicular aberta efetuada na puberdade e na pós-puberdade e suas consequências sobre a gametogênese e o sêmen de touros Nelore. 1996. 167p. Tese (Doutorado em Ciência Animal)–Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

- [3] Garcia JM, Pinheiro LEL, Okuda HT. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. *Ars Veterinária* 1987, 3:47-53.
- [4] Guimarães JD. Avaliação andrológica e estudos quantitativos e qualitativo da espermatogênese de touros F1 mestiços Holandês x zebu e Red Angus x Zebu. 1997. 236f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária - UFMG, Belo Horizonte.
- [5] Lopez R, Thomas MG, Hallford DM, Keisler DH, Silver GA, Obeidat BS, Garcia MD, Krehbiel CR. Case study: metabolic hormone profiles and evaluation of associations of metabolic hormones with body fat and reproductive characteristics of Angus, Brangus and Brahman heifers. *The Professional Animal Scientist* 2006, 22:273–282.
- [6] Abdel-Razek AK, Ali A. Developmental changes of Bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. *Reprod Dom Anim* 2005; 40(1):23-7. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2004.00549.x.
- [7] Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79(3):415-25.
- [8] Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996; 10(20):2577-87.
- [9] Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211(1-2):21-31.
- [10] Rey RA, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5):1220-6. DOI: 10.1210/jcem.77.5.8077315.
- [11] Okay TS. Hormônio anti-mülleriano: importância na prática pediátrica. *Rev Assoc Med Brasileira* 2003; 49(1):16-7.
- [12] Ball BA, Conley AJ, Grundy SA, Sabeur K, Liu IK. Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology* 2008; 69(5):624-31. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.11.009.
- [13] Queiroz, VLD. Hormônio anti-Mulleriano e puberdade em machos Nelore. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia, Universidade federal de mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.
- [14] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para Exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- [15] Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Prepuberal behaviour and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J Anim Sci* 1965; 224:761-5. DOI: doi:10.2527/jas1965.243761x.
- [16] Santos MD, Torres CAA, Ruas JRM, Machado GV, Costa DS, Angulo LM. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000; 29(3):738-44. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000300015>.
- [17] Alencar MM, Trematore RL, Oliveira JAL, Almeida MA. Características de crescimento até a desmama de bovino da raça Nelore e cruzados Charolês x Nelore. *R. Bras. Zootec.* 1998, 27(1):40-46.
- [18] Guimarães JD, Guimarães SEF, Siqueira JB, Pinho RO, Eler JP, Ferraz JBS, Silva MR, Borges JC. Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. *R Bras. Zootec* 2011, 40:379-388.
- [19] Lira TS, Pereira LS, Nepomuceno LL, Alexandrino E, Lopes FB, Lobo RB, Ferreira JL. Interação genótipo-ambiente em pesos pós-desmama de bovinos Nelore

- criados nos estados do Maranhão, Mato Grosso e Pará. Act Vet. Bras. 2013^a. 7(4):282-287.
- [20] Santos GCJ, Lopes FB, Marques EG, Silva MC, Cavalcante TV, Ferreira JL. Tendência genética para pesos padronizados aos 205, 365 e 550 dias de idade de bovinos nelore da região Norte do Brasil. Acta Scientiarum. Animal Sciences 2012, 34:97-101.
- [21] Lira TS, Pereira LS, Lopes FB, Lôbo RB, Santos GCJ, Ferreira JL. Tendências genéticas para características de crescimento em rebanhos Nelore criados na região do Trópico Úmido do Brasil. Ciência Animal Brasileira 2013, 14(1):23-31.
- [22] Cardoso FM. Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebus (*Bos indicus*), da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade. 1977. 113f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.
- [23] Castro VM, Vale Filho VR, Reis SR, Oliveira HN. Puberdade e início de maturação sexual em touros Nelore, de 10-14 meses de idade. Revista Brasileira de Reprodução Animal 1989, 1:183.
- [24] Castro VM, Vale Filho VR, Reis SR, Oliveira HN. Circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos de touros Nelore, de 10 aos 24 meses de idade, criados a pasto, na região de Montes Claros- MG. In: CONGRESSO MINEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4, Belo Horizonte, 1990, p. 18-19.
- [25] Unanian MM. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In: O NELORE DO SÉCULO XXI, 4, 1997, Uberaba, Anais... Uberaba: ABCZ, 1997, p. 51-57.
- [26] Costa e Silva EV, Costa Filho LCC, Souza CC, Oliveira CC, Queiroz VLD, Zuccari CESN. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. Ver. Bras. de Rep. Animal 2015, 39(1):22-31.
- [27] Torres Júnior JR, Henry M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. Animal Reproduction 2005, 2(2):114-121.
- [28] Kao E, Villalon R, Ribeiro S, Berger T. Role for endogenous estrogen in prepubertal Setoli cell maturation. Animal Reproduction Science 2012; 135(1-4):106-12. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.09.003.
- [29] Pasqualini T, Chemes H, Rivarola MA. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. Clinical Endocrinology 1981, 15(6):545-554.
- [30] Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. Anim. Reprod 2015; 12(3):487-97.
- [31] Evans A, Mossa F, Walsh S, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland J, Smith G, Ireland J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. Reprod Domest Anim 2012, 47(S4):31-37.
- [32] Walsh S, Mossa F, Butler ST, Berry DP, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Tempelman RJ, Carter F, Lonergan P, Evans AC. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. J Dairy Sci 2014, 97:4503-4511.
- [36] Barker DJP, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CHD. Growth in utero and serum cholesterol concentration in adult life. British Medical Journal 1993; 307:1524-1527.

Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como preditor da produção de embriões *in vitro* de vacas *Bos indicus*

Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of embryo production in vitro of Bos indicus cows

Resumo- A produção *in vitro* de embriões (PIVE) pode aumentar rapidamente o ganho genético do rebanho de corte e leite, porém a técnica tem seu sucesso muito relacionado com a característica individual do animal da sua população ovariana de folículos antrais. Mesmo sendo o número de folículos antrais variável entre os animais, a concentração do hormônio anti-Mülleriano (AMH) parece ser um marcador endócrino confiável da reserva ovariana, previsão de resposta ovariana e da predição do sucesso do tratamento para fertilização *in vitro*. O objetivo foi verificar a existência de correlação entre a concentração de AMH no momento da aspiração de doadoras Nelore e Gir, a contagem de folículos pré-aspiração, classificação dos complexos *cumulus-oócito* (COC's) e produção de embriões viáveis produzidos *in vitro*. Utilizou-se 15 doadoras de ovócitos (*Bos indicus*) das raças Nelore (n=8) e Gir (n=7), com idades variando de 3 a 19 anos. Foram considerados os dados de contagem folicular antes da aspiração (Fol), qualidade dos COC's aspirados (G1 – COC's grau 1, G2– COC's grau 2, G3– COC's grau 3), embriões viáveis produzidos, idade da doadora, raça, classe de concentração de AMH (AMH1- até 0,114 ng/mL; AMH2- superior a 0,114 ng/mL) e classe de produção de embriões (Classe 1 – 0 a 5 embriões, Classe 2 – mais de 5 embriões). O AMH sérico das doadoras, na média, foi de 0,114 ng/mL, no entanto, nenhuma característica estudada correlacionou-se com os níveis de AMH, nem mesmo quando as doadoras foram divididas em duas classes de concentração (AMH1 e AMH2). Os resultados da comparação das duas raças, mostraram semelhança para todas as características estudadas, com exceção de classificação de COC's G2, na qual as doadoras Gir tiveram significativamente maior produção que as Nelore. As variáveis Fol, G2 e embriões foram significativamente correlacionadas com a idade das doadoras no momento da aspiração, com todas essas características mostrando declínio de produção nas matrizes mais senis. Nas condições do experimento o AMH não pode ser considerado um potencial marcador endócrino de seleção de doadoras para PIV nas raças Nelore e Gir, pois o hormônio não se correlacionou com nenhuma característica estudada.

Palavras-chave: Gir, Nelore, PIVE, reprodução

Abstract- *In vitro* embryo production (IVEP) can rapidly increase genetic gain of the beef and dairy cattle, however the technique has its success too attached to each animal individual characteristic of antral follicles population. Even though the number of antral follicles is variable among animals, the anti-Müllerian Hormone (AMH) levels seems to be a reliable endocrine marker of the ovarian reserve, prediction of ovarian response and success of *in vitro* fertilization treatment. The objective of this present research was to verify the existence of correlation between the AMH levels at the moment of aspiration of Nelore and Gir donors, pre-aspiration follicular count, classification of cumulus-oocyte complexes (COCs) and the production of viable *in vitro* embryos. Fifteen Nelore (*Bos indicus*) oocytes donors (n = 8) and Gir donors (n = 7) were used, with age ranging from 3 to 19 years old. Follicular count before aspiration, aspirated COC's quality (G1 - COC's grade 1, G2-COC's grade 2, G3-COC's grade 2), viable embryos produced, donor's age and breed, AMH concentration levels (AMH1- to 0,114 ng / mL; AMH2- greater than 0.114 ng / ML) and embryo

production class (Class 1 - 0 to 5 embryos, Class 2 - more than 5 embryos) were considered. The average of donors' serum AMH was 0.114 ng/mL; however, none of the studied characteristics is correlated with AMH levels, even when donors were divided into two concentration classes (AMH1 and AMH2). The comparison of results between the two breeds demonstrated similarity for all the characteristics studied, except for COC's G2 classification, in which the Gir donors had significantly higher production than the Nelore ones. Follicular count before aspiration variables, G2 and embryos were significantly correlated to the age of the donors at the time of aspiration and all these characteristics show the decline of senile matrices' production. Under the conditions of this experiment, AMH cannot be considered a potential endocrine marker for donor selection for IVEP in Nelore and Gir breeds, because the hormone did not correlate to any of the characteristics studied.

Keywords: Gir, Nelore, IVEP, Reproduction

Introdução

A produção *in vivo* seguida por transferência de embriões (TE) foi, até meados de 2004, a principal tecnologia utilizada, sendo a partir de então ultrapassada pela produção *in vitro* de embriões (PIVE). Juntas, as tecnologias produziram mais de 300 mil embriões no ano de 2010, sendo a PIVE a responsável por mais de 85% desse valor [1].

A PIVE pode aumentar rapidamente o ganho genético dos rebanhos de corte e leite, porém a técnica tem seu sucesso muito relacionado com a característica individual do animal em população ovariana de folículos antrais - POFA [2]; com isso, a eficiência da PIVE pode ser extremamente comprometida com as variações encontradas de POFA entre as doadoras, mesmo existindo alto nível de repetibilidade na mesma fêmea [3].

A partir dos anos 2000, a POFA vem sendo associada com quantificações hormonais, tais como insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), e o hormônio anti-Mülleriano (AMH) [4,5,6,7,8].

Inicialmente, o AMH foi estudado apenas na diferenciação sexual masculina [9,10], porém, na fêmea, o padrão de concentração do AMH nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento, sugere função importante do AMH na foliculogênese [11,12,13]. Existe relato de que, em ovinos, o AMH predomina no fluido folicular [14]. A maior concentração no fluido folicular é encontrada nos folículos antrais iniciais [15,16,17,18].

Apesar do número de folículos antrais ser variável entre os animais, a concentração do AMH pode ser considerada um marcador endócrino confiável da reserva ovariana [19], previsão de resposta ovariana [20] e da predição do sucesso do tratamento para fertilização *in vitro* em mulheres [21]. Em cabras, a concentração circulante de AMH é capaz de prever a capacidade de uma doadora produzir um número elevado ou baixo de embriões de alta qualidade [22].

Em bovinos, as contagens de POFA e os níveis de AMH tem sido correlacionados com o grupamento genético, evidenciando que os resultados podem variar muito entre raças e espécie [7,23,24].

Neste trabalho, o objetivo foi verificar a existência de correlação da concentração de AMH no momento da aspiração de doadoras Nelore e Gir, com a contagem de folículos pré-aspiração, classificação do complexo *cumulus-oócito* (COC's) e produção de embriões viáveis produzidos *in vitro*.

Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo a manipulação dos animais durante a fase experimental aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo nº 511/2013.

Utilizou-se 15 doadoras de ovócitos (*Bos indicus*) das raças Nelore (n=8) e Gir (n=7), com idades variando de 3 a 19 anos. Realizou-se, no total, 32 aspirações, com variações para cada doadora (1 a 6 aspirações/animal). Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria sp.*, suplementados diariamente com mineralização e água *ad libitum*.

Antes de cada aspiração coletou-se sangue através da punção da veia ou artéria coccígea. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos, conforme Santos et al. (2000) [25]. O soro obtido foi identificado, acondicionado em microtubos tipo eppendorf e armazenado em freezer a -18°C para dosagem de AMH, por meio de kits comerciais.

Quantificou-se as concentrações séricas de AMH (ng/mL) através do método de ELISA, utilizando-se o kit comercial "Bovine AMH ELISA" (AnshLabs®, USA). A sensibilidade do ensaio foi de 0,011 ng/mL e o coeficiente de variação do intraensaio

< 5%. A quantificação foi realizada no Instituto Gênese de Análise Científica (São Paulo, Brasil).

Estimou-se o número de folículos existentes nos dois ovários antes do procedimento de aspiração. Para a recuperação dos ovócitos foi adotada a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia [26].

Após cada aspiração classificou-se os ovócitos de acordo com sua qualidade. Os COC's foram contados e separados em três categorias (G1- grau 1, G2- grau 2, G3- grau 3), de acordo com as características de compactação, número de camadas e transparência das células do *cumulus* e homogeneidade e transparência do ooplasma, utilizando o sistema de classificação descrito por Leibfried e First (1979) [27]. Consideraram-se viáveis os COC's classificados de G1 a G3, sendo os COC's de classe 4 descartados.

Sequencialmente à classificação dos ovócitos, aqueles viáveis foram encaminhados para o laboratório de fertilização *in vitro* (FIV), onde passaram pelo processo completo de PIVE no laboratório comercial Embriza Biotecnologia Ltda. No D7 após a fertilização, os embriões foram classificados em viáveis e não viáveis, segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS 1999) [28].

Para comparações, foram formadas duas classes de produção de embriões e AMH, utilizando-se os valores médios como parâmetro de divisão. Para embrião consideraram-se como classe 1 as doadoras que produziram de zero a cinco embriões, e classe 2 as que produziram mais de cinco embriões. Para AMH, as classes foram em relação a um valor médio de concentração (0,114 ng/mL), em que foi abaixo ou igual a média-AMH1 e AMH2 acima desta média.

As doadoras também foram distribuídas de acordo com a idade (em anos), na qual as mesmas encontravam-se no momento da aspiração; a variação foi de três a 19 anos. Realizou-se teste de normalidade para todas as variáveis dependentes (Fol, G1, G2, G3, embrião e AMH), e aquelas que não apresentaram distribuição normal foram transformadas. A concentração de AMH foi transformada para $\log(x)$ e as variáveis de contagem (Fol, G1, G2, G3, embrião) transformadas para raiz de $(x+1)$. A variável, quando trabalhada como dependente, por não apresentar distribuição normal, foi comparada pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis.

Resultados

O modelo de análise de variância foi significativo para variáveis Fol ($R^2 = 80,17\%$, $CV = 24,11$), observando a variação em função da classe de embrião e idade ($P < 0,05$). A variável G2 ($R^2 = 80,00\%$, $CV = 25,49$) variou em função de raça e idade ($P < 0,05$), e a G3 ($R^2 = 74,04\%$, $CV = 23,73$) apenas para classe de embrião ($P < 0,05$). Para embrião houve significância ($R^2 = 72,77\%$, $CV = 27,730$) em relação à idade ($P < 0,05$). O nível médio do AMH das doadoras avaliadas foi de 0,114 ng/mL, porém os resultados encontrados não mostram correlação dos níveis de AMH e das classes de AMH1 e AMH2 com as características estudadas (Tabela 1).

As doadoras das duas raças apresentaram resultados semelhantes para todas as características estudadas, com exceção de classificação de COC's G2, na qual as doadoras Gir tiveram significativamente maior produção que as Nelore (Tabela 1).

Quando as comparações foram realizadas levando-se em consideração a classe de produção de embrião, encontrou-se diferença significativa para contagem folicular (Fol), ovócitos recuperados G2 e G3, no qual a Classe 2 apresentou melhores resultados (Tabela 2).

As variáveis Fol, G2 e embriões foram significativamente correlacionadas com a idade das doadoras no momento da aspiração, com todas essas características mostrando declínio de produção nas matrizes mais senis. As doadoras apresentaram um crescimento na produção de embriões até os 9 anos de idade, a partir da qual os valores apresentaram uma queda significativa. O mesmo ocorreu com a contagem de folículos antes da aspiração (Tabela 3).

Tabela 1. Comparação da idade, concentração de AMH, contagem folicular, produção ovocitária e embrionária de doadoras Nelore e Gir e valores médios das duas raças

	Nelore	Gir	Geral
Idade (anos)	11,60± 1,02	3,50± 0,23	8,5 ± 0,95
AMH (ng/mL)	0,102± 0,020 ^a	0,132± 0,040 ^a	0,114 ± 0,019
Fol (n)	13,21± 2,70 ^a	20,00± 3,21 ^a	14,14 ± 2,40
G1 (n)	0,47± 0,25 ^a	0,17± 0,17 ^a	0,35± 0,16
G2 (n)	3,63± 1,12 ^b	5,00± 1,18 ^a	4,16± 0,82
G3 (n)	3,84± 0,63 ^a	9,83± 1,58 ^a	6,16± 0,89
Embriões viáveis (n)	4,10± 0,98 ^a	5,33± 1,33 ^a	4,58± 0,78

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias ($P > 0,05$) para teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Comparação idade, concentração do AMH, contagem folicular, produção ovocitária das duas classes de produção de embrião, Classe 1 (0 a 5) e Classe 2 (>5)

	Classe 1	Classe 2
Idade (anos)	9,33 ± 1,33 ^a	6,80 ± 1,07 ^a
AMH (ng/mL)	0,116 ± 0,023 ^a	0,118 ± 0,039 ^a
Folículos (n)	14,06 ± 2,93 ^b	16,67 ± 4,59 ^a
G1 (n)	0,09 ± 0,09 ^a	0,90 ± 0,43 ^a
G2 (n)	2,90 ± 0,82 ^b	6,80 ± 1,63 ^a
G3 (n)	4,76 ± 0,88 ^b	9,10 ± 1,76 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias (P>0,05) para teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

Tabela 3. Comparação da concentração do AMH, contagem folicular, produção ovocitária e embrionária de acordo com a idade de doadoras de ovócito de diferentes idades

	Idade (anos)				
	3 anos	4 anos	5 anos	7 anos	9 anos
AMH (ng/mL)	0,111±0,031 ^a	0,055 ± 0,045 ^a	0,308 ± 0,173 ^a	0,091 ± 0,042 ^a	0,360 ± 0,00 ^a
Folículos (n)	20,00 ± 1,00 ^{abc}	26,00 ± 0,00 ^{ab}	15,00 ± 0,00 ^{abc}	13,33 ± 0,33 ^{abc}	38,00 ± 0,00 ^a
G1 (n)	0,22 ± 0,22 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,00 ± 0,00 ^a
G2 (n)	5,89 ± 1,47 ^{bc}	1,50 ± 0,50 ^{cd}	2,50 ± 0,50 ^{cd}	0,33 ± 0,33 ^d	19,00 ± 0,00 ^a
G3 (n)	9,67 ± 1,77 ^a	10,50 ± 4,50 ^a	8,00 ± 6,00 ^a	6,33 ± 1,85 ^a	19,00 ± 0,00 ^a
Embriões viáveis(n)	6,89 ± 1,40 ^b	0,50 ± 0,50 ^c	2,00 ± 2,00 ^{bc}	4,67 ± 1,76 ^{bc}	16,00 ± 0,00 ^a
	10 anos	11 anos	14 anos	19 anos	
AMH (ng/mL)	0,053 ± 0,020 ^a	0,198 ± 0,00 ^a	0,174 ± 0,014 ^a	0,044 ± 0,034 ^a	
Folículos (n)	15,67 ± 6,56 ^{abc}	20,00 ± 0,00 ^{abc}	6,00 ± 0,58 ^{bc}	5,00 ± 1,15 ^c	
G1 (n)	0,83 ± 0,65 ^a	2,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	
G2 (n)	5,83 ± 0,87 ^{bc}	9,00 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,33 ^d	0,75 ± 0,48 ^d	
G3 (n)	5,50 ± 0,56 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	0,67 ± 0,33 ^a	1,25 ± 0,75 ^a	
Embriões viáveis(n)	6,33 ± 1,08 ^b	4,00 ± 0,00 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^c	0,75 ± 0,48 ^c	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias (P>0,05) para teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

Discussão

O AMH sérico médio das doadoras foi de 0,114 ng/mL; no entanto, nenhuma característica estudada correlacionou-se com os níveis de AMH, nem mesmo quando as doadoras foram divididas em duas classes de concentração de AMH (AMH1 e AMH2).

Em humanos os resultados são distintos dos encontrados em nosso trabalho, pois os níveis séricos do AMH são um marcador preditivo da resposta ovariana, em mulheres, submetidas ao procedimento de fertilização *in vitro*, refletindo-se na reserva ovariana, e com correlação significativa com o número de ovócitos aspirados [29] e relação positiva do AMH com a qualidade ovocitária em mulheres [30,31].

Dados de um trabalho [32], também com a raça Nelore, sugerem resultados diferentes dos encontrados neste experimento, de que o AMH é um potencial marcador de seleção de doadoras Nelore, pois verificaram os níveis de concentrações do AMH correlacionados positivamente com o total de folículos aspirados, COC's recuperados,

número de COC's viáveis, e número de embriões produzido por sessão de aspiração [32]. Esses resultados distintos ao do presente experimento, talvez possam ser explicados por dois fatores, sendo um deles a diferença dos níveis de AMH entre os estudos. Guerreiro et al. (2014) [32] dividiu as doadoras em duas classes de níveis de AMH (alto $2,0 \pm 0,3$ ng/mL e baixo $0,5 \pm 0,05$ ng/mL), enquanto que no nosso experimento as concentrações do AMH foram muito mais baixas. Outro fator que pode ter interferido na divergência de resposta é que, enquanto trabalhamos com vacas que variaram a idade de 3 a 19 anos, os outros autores utilizaram apenas novilhas Nelore. A senilidade em mulheres e em animais, de forma geral, traz consequências para a reprodução, tais como diminuição no número de ovócitos e queda na fertilidade evidenciada antes da total depleção da reserva de folículos ovarianos [33]. Tal fato pode, então, explicar as diferenças nos níveis de AMH, pois a expressão do mesmo é observada nas células de folículos em crescimento, sendo que a grande maioria dos trabalhos propõe a expressão em células da granulosa de folículos primários com o início da síntese hormonal, e a sua máxima produção em folículos secundários e antrais iniciais [34]. Então, se há uma diminuição no número de folículos, há um declínio nos níveis de AMH em vacas mais velhas em relação as novilhas.

Esses resultados já possibilitam discutir a relação da idade das doadoras com as características estudadas (Tabela 3), uma vez que as variáveis Fol, G2 e embriões foram significativamente correlacionadas com a idade das doadoras no momento da aspiração, com todas elas mostrando declínio de produção nas matrizes mais senis. As doadoras apresentaram um crescimento na produção de embriões viáveis até os 9 anos de idade, a partir da qual os valores apresentaram uma queda significativa, de forma semelhante ao comportamento da variável FOL.

Experimentos mostram que os resultados que encontramos estão de acordo com o esperado para doadoras de ovócito, pois a quantidade de ovócitos viáveis para produção de embriões de PIVE está ligada tanto aos fatores extrínsecos como às condições ambientais e manejo, como as funções do próprio ovário e do seu estoque de folículos, em média de 50.000 a 100.000 folículos primordiais existentes ao nascimento [35]. Os ovócitos de fêmeas de um mês de idade já são passíveis de produzirem embriões de FIV, porém com um número significativamente baixo de blastocistos viáveis, quando comparados aos ovócitos de doadoras adultas [36,37]. A taxa de desenvolvimento em blastocisto é maior para vacas adultas quando comparadas com novilhas [38], mas a disponibilidade de COC's viáveis para

exploração da PIVE decresce em vacas a partir dos nove anos de forma significativa [35,39], como parcialmente verificamos neste experimento.

Em doadoras Holandesas (*Bos taurus*) a idade foi diretamente proporcional ao número de COC's produzidos. Já a relação com a qualidade dos COC's mostrou-se crescente quando foram comparadas fêmeas de dois aos oito anos, quando a partir de então, a qualidade dos COC's das vacas diminuiu, permitindo concluir que existe uma estreita relação da idade da doadora e a quantidade e qualidade dos COC's aspirados [40].

A resposta da idade em relação à produção de embrião, embora em *Bos taurus*, e com utilização de superovulação, também foi descrita. Donaldson (1984) [41] acompanhou por 10 anos 56 vacas Texas Longhorn, com idades variando de 3 a 22 anos, que passaram por protocolos de SOV, e encontrou declínio na produção de embriões transferíveis a partir dos 10 anos das doadoras. As fêmeas de 3 a 6 anos apresentavam média de 23 embriões viáveis, número significativamente superior quando comparado com as matrizes de 14 a 22 anos que produziam 9 embriões na média. No nosso experimento a produção máxima de embriões foi das doadoras com 9 anos ($16,00 \pm 0,00$).

Os resultados da comparação das duas raças aspiradas, mostraram semelhança para todas as características estudadas, com exceção de classificação de COC's G2, na qual as doadoras Gir tiveram significativamente maior produção que as Nelore (Tabela 1).

Os níveis de AMH não foram significativamente diferentes entre as duas raças, o que pode ter ocorrido por se tratarem de duas raças de uma mesma espécie *Bos indicus*, porém alguns trabalhos tem mostrado diferença nos níveis de AMH em relação aos grupamentos genéticos [24,32,34]. Quando foram comparadas fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, as primeiras apresentaram maior população ovariana de folículos antrais e concentração superior de AMH [7].

As doadoras Nelore tiveram na média 7,94 ovócitos viáveis recuperados após cada seção de aspiração, resultado muito superior ao relatado por Zamboni et al. (2010) [42] que, no seu grupo controle, sem estímulo hormonal, encontraram 1,07 ovócitos aspirados na média. Em relação às doadoras Gir o mesmo resultado superior também foi encontrado, no nosso trabalho a média das vacas Gir foi de 15 ovócitos por aspiração, enquanto que Oliveira et al. (2011) [43] apresentaram uma média de 3,1 ovócitos aspirados para doadoras Gir. Um resultado mais próximo do que encontramos para as doadoras Gir foi descrito por Oliveira et al. (2013) [44] que aspiraram, na média, 8,49 ovócitos viáveis para vacas Gir.

Os resultados deste estudo, referentes às contagens foliculares antes da aspiração, mostraram-se superestimados em relação à quantidade de COC's recuperados. Respostas distintas são descritas para mulheres, pois a contagem ecográfica de folículos antrais parece refletir o número de folículos primordiais [45], podendo ter confiável grau de correlação não apenas com baixas respostas, como, também, com relação ao número de ovócitos aspirados [46].

A produção média de embriões foi de $4,58 \pm 0,78$, levando em consideração as duas raças; para as doadoras Nelore a produção foi de $4,10 \pm 0,98$, valor abaixo dos encontrados por Beltrame et al. (2010) [47] na mesma raça, que obtiveram média de embriões de PIVE $6,43 \pm 5,5$, porém, os autores ainda descrevem que a maior frequência de produção de embriões de PIVE em Nelore (52,09% das vezes) é de 1 a 5 embriões. Nonato Jr et al. (2006) [48], compararam quatro protocolos de aspirações em doadoras Nelore e a produção de embriões viáveis variou de $6,1 \pm 1,0$ a $12,0 \pm 2,6$, resultado também superior ao encontrado neste experimento. As doadoras Gir atingiram a média de $5,33 \pm 1,33$ embriões viáveis por aspiração, o que está acima do verificado por Oliveira et al. (2013) [44], de $3,34 \pm 0,35$ embriões de média para raça Gir.

Embora a única diferença encontrada entre as raças foi a maior produção de COC's G2, esperava-se que as doadoras Nelore produzissem mais embriões que as vacas Gir, o que não aconteceu. Existem duas possíveis explicações, para a maior produção de G2 e a mesma produção de embriões nas raças; uma é a idade média das doadoras, pois as vacas Nelore tinham $11,60 \pm 1,02$ anos e as Gir $3,50 \pm 0,23$ anos, resposta já discutida anteriormente em relação à idade das fêmeas e a relação com a produção de embriões. O outro fato que pode ser relevante é a diferença de metabolismo existente entre as doadoras utilizadas no experimento. As vacas Nelore eram doadoras de embrião que já haviam sido aspiradas por mais vezes antes do experimento, e que não necessariamente foram selecionadas para produção ou reprodução e, sim, selecionadas para o fenótipo. Já as doadoras Gir eram animais selecionados para alta produção de leite, suplementadas desde jovem para este fim, os quais podem ter metabolismo mais acelerado em relação às doadoras Nelore, refletindo-se no metabolismo ovariano. Segundo alguns autores, fatores nutricionais são capazes de afetar o crescimento folicular e a produção de embriões, entre os quais podem ser citados teor de proteína da dieta [49], níveis de vitamina A [50], teor de gordura [51] e condição corporal e energia na dieta [52,53].

Quando as doadoras foram divididas nas classe de produção de embrião, os resultados mostraram que vacas com maior contagem folicular antes da aspiração apresentam maior produção de COC's aspirados e embriões viáveis (Tabela 2). Esses dados corroboram Guerreiro et al. (2014) [32], que mostraram que as doadoras Nelore apresentaram correlação positiva com a quantidade de folículos aspirados, COC's recuperados e embriões viáveis produzidos.

Nas condições do experimento, o AMH não pode ser considerado um potencial marcador endócrino de seleção de doadoras para PIV nas raças Nelore e Gir, pois o hormônio não se correlacionou à nenhuma das características estudadas.

AGRADECIMENTO

A Embriza Biotecnologia Ltda por nos auxiliar com os dados dos animais utilizados na pesquisa e a Fundect pela concessão de bolsa de Doutorado e apoio financeiro para pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MPC, Amargo SA. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on brazilian embryo industry and animal production. Acta. Scie. Vet. 2010; 38(2):661-674.
- [2] Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. Anim. Reprod 2015; 12(3):487-97.
- [3] Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans AC. 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 2007; 22(6):1687-95. DOI: 10.1093/humrep/dem071.
- [4] Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC Jr, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wettemann RP. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. Journal of Animal Science 2000; 78(5):1291-302.
- [5] Fortune JE, Yang MY, Muruvi W. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. Reproduction, Fertility and Development 2010; 23(1):15-22. DOI: 10.1071/RD10250.
- [6] Satrapa RA, Castilho AS, Razza EM, Pegorer MF, Puelker R, Barros CM. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. Animal Reproduction Science 2013; 138(3-4):155-158. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.023.
- [7] Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Rennó FP, Baruselli PS. 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos*

- taurus (Holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 2014; 49(3):448-452. DOI: 10.1111/rda.12304.
- [8] Sales JN, Iguma LT, Batista RI, Quintão CC, Gama MA, Freitas C, Pereira MM, Camargo LS, Viana JH, Souza JC, Baruselli PS. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science* 2015; 98(5):3086-99. DOI: 10.3168/jds.2014-8858.
- [9] Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews* 1993; 14(2):152-64. DOI: 10.1210/edrv-14-2-152.
- [10] Josso N, di Clemente N. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14(2): 91-7.
- [11] Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 2002a; 124(5):601-9.
- [12] Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10(2):77-83.
- [13] Thomas FH, Telfer EE, Fraser HM. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2007; 148(5):2273-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1501>.
- [14] Campbell BK, Clinton M, Webb R. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology* 2012; 153(9):4533-43.
- [15] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JÁ, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002b; 143(3):1076-84. DOI: 10.1210/endo.143.3.8691.
- [16] Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91(10): 4064-9. DOI: 10.1210/jc.2006-1066.
- [17] Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92(5):1796-802. DOI: 10.1210/jc.2006-1053.
- [18] Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2008; 89(3):586-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.080>.
- [19] Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé J-L, Sapa J, Phocas F, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Fabre S. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; 25(1):1-16. DOI: 10.1071/RD12270.
- [20] Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertility and Sterility* 2005; 83(4):979-87. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.029.

- [21] Gruijters MJG, Visser JA, Durlinger Alexandra LL, Themmen A. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211(1-2):85-90. DOI: 10.1016/j.mce.2003.09.024.
- [22] Monniaux, D, Baril, G, Laine, AL, Jarrier, P, Poulin, N, Cognie, J, Faber, S. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 2011, 142(6):845-854.
- [23] Baldrighi JM, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção MEOA. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Dom Anim* 2014; 49(6):1015-20. DOI: 10.1111/rda.12430.
- [24] Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, Santos JEP. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci* 2014; 97(11):6888-900. DOI: 10.3168/jds.2014-7908.
- [25] Santos MD, Torres CAA, Ruas JRM, Machado GV, Costa DS, Angulo LM. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000; 29(3):738-44. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000300015>
- [26] Rodrigues CFM, Garcia JM. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Suplemento* 2000, 28:186-187.
- [27] Leibfried-Rutledge, ML, First, NL. Characterization of bovine follicular oocytes 496 and their ability to mature in vitro. *Journal of Ani. Sci.* 1979, 48: 76-86.
- [28] IETS (International Embryo Transfer Society), 1999. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, Savoy, Illinois, USA, 180p.
- [29] Riggs R, Kimble T, Oehninger S, Bocca, S, Zhao Y, Leader B, Stadtmauer L. Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. *Fertil. Steril.* 2011, 95(1):410-412.
- [30] Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti- -müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril.* 2005^a, 84:167-173.
- [31] Fanchin R, Taieb J, Mendez Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005^b, 20(4):923-927.
- [32] Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, Bayeux BM, Dias EA, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RN, Baruselli PS. Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol* 2014; 49:96-104. DOI: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002.
- [33] Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001, 55:1303-1322.
- [34] Rocha RMP, Alves AMCV, Lima LF, Araujo VR, Bernuci MP, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (HAM). *Acta Scientiae Veterinariae* 2013; 41:1-12.
- [35] Moreira da Silva JF. Superovulation chez les bovins, 1990. 103p. Tese. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal. 1990.
- [36] Lévesque JT, Sirard MA. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reproduction Nutrition Development* 1994; 34(2):133-9.

- [37] Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995; 103(1):115-20.
- [38] Prescicce GA, Jiang S, Simkim M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 1997;56:386-392.
- [39] Hasler JF, Broke GP, McCauley AD. The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology* 1981; 15(1):109. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80026-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80026-X).
- [40] Reis A, Metelo R, Santos P, Moreira da Silva F. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e embriões produzidos in vitro. *Braz J Vet Res Anim Sci.* São Paulo, 2006; 43(5):629-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26571>
- [41] Donaldson LE. Effect of age of donors cows on embryo production. *Theriogenology* 1984, 21(6):963-967.
- [42] Zaniboni L, Souza BG, COLOMBO AHB, Rigolon LP, Cavalieri FLB. Obtenção de oócitos e produção de embriões in vitro de vacas Nelore superestimuladas com FSH e eCG. In: Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, 5, Maringá, PR. Anais...V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica. Maringá, PR, 2010.
- [43] Oliveira MEF, Ferreira RM, Mingoti GZ. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.* 2011, 35(4):418-432.
- [44] Oliveira CS, Serapião RV, Camargo AJR, Ferreira MBD, Freitas C, Verneque RS. Produção in vitro de embriões bovinos F1 a partir de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro e Holandesa. Anais...X Simposio Brasileiro de melhoramento Animal 2013; Uberaba-MG 2013.
- [45] Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive 18 age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum. Reprod.* 2004, 19(7).
- [46] Tomas C, Nuojua-Huttunen S, Martikainen H. Pretreatment 1. Transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1997, 12(2):220-223.
- [47] Beltrame RT, Quirino CR, Barioni LG, Dias AJB, Souza PM. Análise da produção de embriões na fertilização in vitro e transferência de embriões para doadoras Nelore. *Ci. Anim. Bras.* 2010; 11(1):17-23.
- [48] Nonato Jr I, Pontes JHF, Ereno JR JC, Gimenes LUG, Torres Jr JRS, Baruselli PS. Utilização de progesterona exógena em protocolos de OPU de vacas Nelore: resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34:452.
- [49] Garcia-Bojalil CM, Sataples CR, Thatcker WW, Drost M. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1994; 77:2537-2548.
- [50] Shaw DW, Farim PW, Washburn R. Effect of retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology* 1995; 44:51-58.
- [51] Thomas MG, Bao B, Williams GL. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence growth in cows fed isoenergetic diets. *Journal of Animal Science* 1997; 75:2512-2519.
- [52] O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition hormone concentration in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 118:303-313.

- [53] Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 2001; 55:1323-1340.