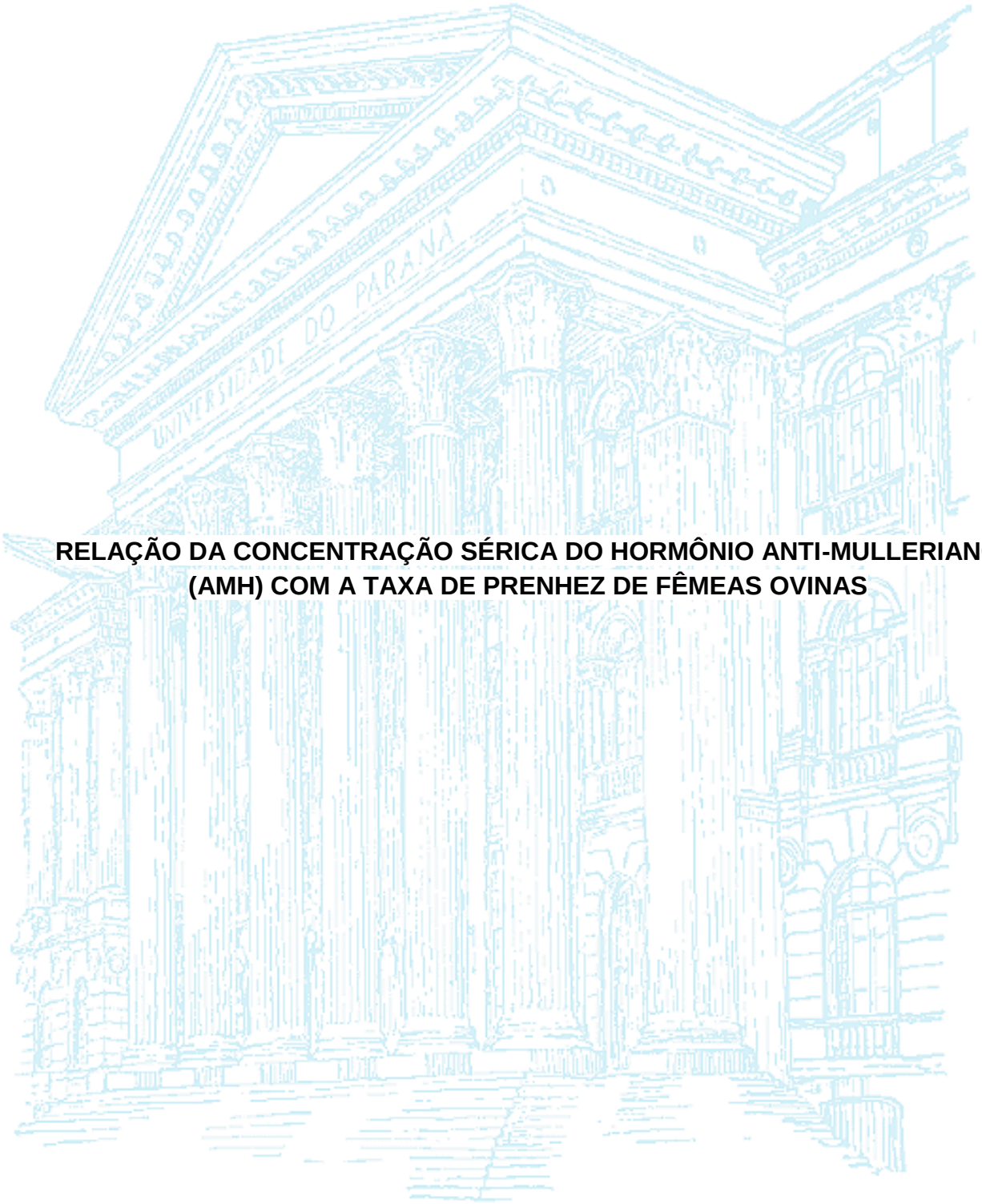
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
UFPR - CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) COM A TAXA DE PRENHEZ DE FÊMEAS OVINAS

CURITIBA
2017

ANA CAROLINA CARVALHO NEVES

RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO (AMH) COM A TAXA DE PRENHEZ DE FÊMEAS OVINAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós - graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Profa.Dra. Alda Lucia Gomes Monteiro

Coorientadores: Prof.Dr. Odilei R. Prado e Profa.Dra. Wanessa Blaschi

CURITIBA
2017

N514 Neves, Ana Carolina Carvalho
Relação da concentração sérica do hormônio anti-mulleriano (AMH) com a taxa de prenhez de fêmeas ovinas / Ana Carolina Carvalho Neves. Curitiba: 2017.
49 f.; il.

Orientadora: Alda Lucia Gomes Monteiro
Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

1. Ovinos-Melhoramento. 2. Ovinos-Reprodução. 3. Ovinos-Genética. I. Monteiro, Alda Lucia Gomes. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDU 636.3

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
Setor de CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA CAROLINA CARVALHO NEVES** intitulada: "**Relação entre concentrações séricas de hormônio anti-mulleriano (AMH) e taxas de prenhez em fêmeas ovinas**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 28 de Abril de 2017.

ALDA L. GOMES MONTEIRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO MARCONDES SENEDA
Avaliador Externo (UEL)

THALES RICARDO RIGO BARREIRO
Avaliador Externo (UENP)

FRANCISCO ARMANDO DE AZEVEDO SOUZA
Avaliador Externo (UENP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus， por ter me guiado e orientado nos momentos de dificuldade, concedido me paz e confiança nos momentos de receio e sabedoria nos momentos de apreensão e dúvidas.

Agradeço aos meus pais Gilson Ferreira Neves e Edelvais Carvalho de Menezes Neves, por tudo que sou hoje. Sou grata por não me deixarem caminhar sozinha e terem me concedido a oportunidade de estudar. Vocês são os meus exemplos de fé, amor, e perseverança.

À minha irmã Ludmila Carvalho Neves, pelo apoio, companheirismo, por ter me ajudado e lutado por mim e pelo meu sucesso, peça fundamental nesta vitória.

Aos meus avós maternos (*in memorian*), Ana de Carvalho Menezes dos Santos e Sebastião dos Santos, e paternos Olga Ferreira Neves e Waldey Ferreira Neves, minhas fontes de inspiração todos os dias, base fundamental da minha criação e educação.Agradeço por toda a confiança, ensinamentos, e que mesmo de tão longe ajudaram e abençoaram essa caminhada; aprendi com vocês o que é honestidade e caráter, sou eternamente grata.

Agradeço Professora Dra. Alda Lúcia Monteiro, por ter me acolhido em seu grupo. Por toda a paciência, ensinamentos e oportunidades. Obrigada por ser exemplo de profissional, ética e compromisso, por sua amizade, palavras de encorajamento, confiança e por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

Aos estagiários do LAPOC-UFPR: Aline F., André Z., Fernanda G., Julia M., Nicole T., Paula H., Ricardo e Alexandre. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho e o tornaram muito mais fácil, agradeço por terem proporcionado momentos de diversão, alegrias e sofrimento (muitas das vezes compartilhado), considero vocês como meus verdadeiros amigos. Agradeço aos pós-graduandos: Laura F., Mylena Peres, Rafael Batista, Karla F.Campos e Elisio C.Debortoli, vocês são pessoas maravilhosas, a convivência me proporcionou momentos muito especiais na minha vida. Nós estudamos, nos dedicamos, brigamos, mas principalmente crescemos psicologicamente e profissionalmente juntos. Hoje, eu olho para trás e tenho orgulho de tudo que vivemos! Agradeço pela imensa ajuda na execução do projeto, solicitude, pelo companheirismo, força, palavras de ânimo e pelos momentos de descontração durante os muitos dias que ficamos na fazenda. Família inesquecível! Peço a Deus que os abençoe muito.

Aos médicos veterinários e co-orientadores, Odilei R. Prado e Wanessa Blaschi por suas contribuições no desenvolvimento do experimento, pela paciência, atenção, dedicação, conversas e conselhos.

A cada funcionário do LAPOC-UFPR, que mesmo com toda a simplicidade e dificuldade de compreender o que estava sendo desenvolvido, estavam sempre dispostos a nos apoiar e auxiliar em qualquer atividade. Foi gratificante ter convivido com cada um de vocês, ter conquistado a amizade e a confiança ao longo do mestrado.

Às diferentes instituições que colaboraram na logística e desenvolvimento da pesquisa: Universidade Federal do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Universidade Tuiuti do Paraná e o Centro de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos de Aragon em Zaragoza- Espanha.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão; perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve.

A vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

No âmbito de um sistema de produção que visa maior taxa de prenhez, nascimentos múltiplos e melhor crescimento do cordeiro, buscam se estratégias para diminuir o tempo para início do primeiro estro e aumentar a eficiência de produção. Através da manipulação dos fatores que alterem e antecipem a puberdade ou que identifiquem as fêmeas mais precoces no rebanho. A intenção é selecionar os animais com maior ciclicidade, aumentar o número de cordeiros destinados a abate e reduzir o período de entressafra de produção. Este trabalho objetivou: Avaliar a relação entre as concentrações plasmáticas do hormônio anti-mulleriano com a contagem folicular antral, presença da ovulação e taxa de prenhez de cordeiras pré-púberes da raça White Dorper. O estudo foi conduzido no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC), da Fazenda Experimental do Canguiri, pertencente à Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado no município de Pinhais, Paraná, Brasil. O período experimental foi de junho de 2015 a dezembro de 2016. Foram avaliadas 37 cordeiras da raça White Dorper, com idade média 92 ± 6 dias, pesando 27 ± 2 kg e escore de condição corporal (ECC) 3 ± 0,4. Para mensuração do hormônio anti-mulleriano, foi colhido sangue diretamente por punção da veia jugular, usando tubos vacutainer heparinizados de 5 mL, aos 90,120,150 e 180 dias de idade das cordeiras. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2100 rpm por 25 minutos a temperatura de 10º C, e transferido o plasma para microtubos do tipo eppendorf, em seguida, as amostras foram armazenados a temperatura -20 ºC até o momento da análise do AMH (Kit ELISA MIS/AMH – Beckman Coulter). As cordeiras pré-púberes foram avaliadas aos 120, 150, 180 dias de idade, quanto a contagem folicular antral, presença da ovulação, após a administração exógena de eCG (600 UI), pela técnica de videolaparoscopia. As correlações entre variáveis como: ocorrência de ovulação (1 =ovulação, 0 = não ovulação), número de ovulações, concentração plasmática de AMH, idade e peso corporal, foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (ρ). As variáveis contínuas: peso vivo, concentração plasmática de AMH, ganho de peso médio diário (GPMD) foram testadas por modelos lineares gerais (ANOVA). Aos 120, 150 e 180 dias, a média de produção folicular das cordeiras foi de 4 ± 0, 7 ± 0 e 9 ± 2, respectivamente. A concentração plasmática de AMH foi diretamente relacionada com a presença de ovulação em resposta a administração de eCG (p = 0,37; P < 0,05). Os animais que ovularam apresentam concentrações de AMH cerca de duas vezes (133 ± 32 pg / ml) maior do que animais que não ovularam (60 ± 9.2 pg / ml; P <0,05). Em contrapartida, o AMH não foi relacionado com o número de ovulações (p = 0,21; P > 0,05), com a idade (p = -0,03; P > 0,05) e peso (p = -0,15; P > 0,05). As concentrações plasmáticas de AMH foram positivamente correlacionadas com a taxa de prenhez das cordeiras em idade adulta (p = 0,62; P<0,05). Conclui se que a concentração plasmática de AMH pode ser marcador confiável do estado ovariano, além de assegurar a resposta a protocolos hormonais, capacidade de ovulação e fertilidade em animais pré-púberes.

Palavras chaves: puberdade, ovulação, contagem folicular antral, precocidade e eCG.

ABSTRACT

Under a production system that seeks greater fertility, multiple births and better growth of lamb, seeks strategies to decrease the time for start of the first estrus and increase production efficiency, aiming at the manipulation of the factors that change and anticipate puberty or to identify the earliest females, with the intention of selecting animals with greater cyclicity, increasing the number of lambs destined for slaughter, and reducing the off-season of production. This study aimed to: evaluate the relationship between plasma concentrations of anti-mullerian hormone with antral follicular count, ovulation presence, and pregnancy rate of prepubertal ewes of the White Dorper breed. The experiment was carried out at the Sheep and Goat Production and Research Center (LAPOC), Federal University of Paraná (UFPR) from August 2015 to December 2016. We evaluated 37 White Dorper, with 92 ± 6 days and weight 27 ± 2 kg and body condition score (BCC) 3 ± 0.4. For measurement of the antimullerian hormone, blood was collected directly by puncture of the jugular vein, using 5 mL heparinized vacutainer tubes, at 90,120,150 and 180 days of age of the lambs. Immediately after collection, the blood was centrifuged at 2100 rpm for 25 minutes at a temperature of 10 ° C, and the plasma was transferred to eppendorf type microtubes, then the samples were stored at -20 ° C until the time of AMH analysis (MIS / AMH ELISA Kit - Beckman Coulter). Pre-pubertal ewes were evaluated at 120, 150, and 180 days of age on antral follicular count after exogenous administration of eCG (600 IU) by videolaparoscopy. The correlations between variables such as: ovulation occurrence (1 = ovulation, 0 = non ovulation), number of ovulations, plasma concentration of AMH, age and body weight were evaluated by the Spearman correlation coefficient (ρ). Continuous variables: live weight, plasma AMH concentration, daily mean weight gain were tested by general linear models (ANOVA). At 120, 150 and 180 days the mean follicle production of the ewes was 4 ± 0, 7 ± 0 and 9 ± 2, respectively. The plasma concentration of AMH was directly related to the presence of ovulation in response to eCG administration ($p = 0.37$; $P < 0.05$), and animals that exhibited the presence of ovulation demonstrated concentrations of AMH about two times higher (133 ± 32 pg / ml) than animals that not ovulate (60 ± 9.2 pg / ml; $P < 0.05$). In contrast, AMH was not related to the number of ovulations ($p = 0.21$, $P > 0.05$) with age ($p = -0.03$, $P > 0.05$) and weight ($p = 0.15$, $P > 0.05$) of the animals. The plasma concentrations of AMH were positively correlated with the pregnancy rate of adult lambs ($p = 0.62$, $P < 0.05$). It was concluded that the plasma concentration of AMH may be a reliable marker of the ovarian state, besides ensuring the response to hormonal protocols, ovulation capacity and fertility in prepubertal animals.

Keywords: puberty, ovulation, antral follicular count, ovarian reserve, precocity, eCG.

Lista de Figuras:

Figura 1 - Principais etapas do procedimento de laparoscopia; 36

Figura 2- Procedimentos para análise de AMH;; 38

Figura 3- Concentrações do hormônio anti-mulleriano (AMH) nas idades pré-púberes (90 a 180 dias) de cordeiras da raça White Dorper; 40

Figura 4-Concentração plasmática de AMH (pg/ml) após estimulação hormonal por eCG (600 UI) para com o número de ovulações observadas nas idades de 120, 150 e 180 dias de cordeiras White Dorper; 41

Figura 5 - Peso corporal (kg) de cordeiras da raça White Dorper do nascimento até os 180 dias de idade; 43

Figura 6-Relação entre AMH na idade pré-puberal e a fertilidade de cordeiras White Dorper; 44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Efeito da idade sobre as variáveis reprodutivas de fêmeas ovinas da raça White Dorper; 42

Tabela 2- Valores de correlação entre a concentração plasmática de AMH e a taxa de prenhez de fêmeas ovinas da raça White Dorper em idades pré-puberais;.....45

Tabela 3 - Valores de correlação entre a concentração plasmática de AMH o peso (kg), ovulações, número de ovulações e contagem folicular antral (un) de fêmeas ovinas da raça White Dorper em idades pré-puberais; 49

Tabela 4 - Valores de correlação entre a contagem folicular antral, o peso (kg), ovulações, número de ovulações de fêmeas ovinas da raça White Dorper em idades pré-puberais;.....49

Tabela 5 – Valores de correlação entre as idades pré-puberais de avaliação e o peso (kg), GPMD (g), contagem folicular antral (un), ovulações, número de ovulações e concentrações plasmáticas do hormônio anti-mulleriano (pg/ml) em femeas ovinas da raça White Dorper; 51

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 15

2.1 Objetivo Geral 15

2.2 Objetivos Específicos 15

3 HIPÓTESE 15

4 REVISÃO DE LITERATURA 16

4.1 Identificação precoce da fertilidade de fêmeas ovinas jovens 16

4.2 Fotoperíodo e Sazonalidade reprodutiva: 17

4.3. Ciclo Estral 19

4.4 Foliculogênese 19

4.5 Indução a puberdade de fêmeas 22

4.6 Hormônio Anti- Mulleriano 23

4.7 Referências Bibliográficas 25

5 MATERIAL E MÉTODOS 33

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

7 CONCLUSÃO 45

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

ANEXOS 49

REFERÊNCIAS GERAIS 52

1INTRODUÇÃO

A produção de ovinos para carne vem se destacando nos últimos anos, como importante cadeia produtiva do agronegócio. A sazonalidade reprodutiva presente na maioria das raças ovinas especializadas na produção de carne e criadas na região Sul do Brasil, influencia de forma negativa a produção constante de carne durante o ano.

Com o intuito de minimizar os efeitos da sazonalidade reprodutiva dos ovinos e aumentar o número de cordeiros disponíveis no mercado, pesquisas têm sido realizadas visando à manipulação dos fatores que alterem e antecipem a puberdade das fêmeas. CARTA et al., (2009) afirmaram que em rebanhos comercias que apresentam elevada precocidade sexual e fertilidade possuem maior disponibilidade de animais, tanto para venda, como para seleção, permitindo progressos genéticos e maior lucratividade.

As fêmeas de todas as espécies domésticas apresentam um estoque finito de células germinativas, que é estabelecido na vida fetal e que futuramente será utilizado durante a vida reprodutiva adulta. Apesar de um vasto estoque folicular (100.000-200.000 em ovinos; mais de 200.000 folículos em bovinos) (BAKER et al., 1996) apenas 1% dessa população atinge a fase pré-ovulatória, e, com a sua maioria sofrendo o processo de atresia (SCARAMUZZI et al., 2006). Em novilhas, estudos recentes sugerem que o número de folículos antrais em crescimento presentes nos ovários, apresentam uma alta variabilidade e repetibilidade entre os indivíduos na resposta gonadotrofinas, tornado se possível à classificação (baixa, média e alta produção folicular) e a seleção dos animais que promovam impacto importante nos índices produtivos e econômicos (IRELAND et al., 2011).

O hormônio anti-mulleriano (AMH), conhecido como o melhor marcador endócrino da reserva ovariana de folículos em crescimento, fornece novas informações sobre o ovário, pool de reserva folicular e preditor da resposta ovariana à gonadotrofinas em humanos (GRUIJTERS et al., 2003; VISSER et al., 2006), ratos (KEVENAAR et al., 2006) e bovinos (RICO et al., 2009) e em ovinos (LAHOZ et al., 2012). Resultados recentes demonstram que a expressão de AMH é alta em células de granulosa de pequenos folículos antrais que sua função esta relacionada em regular ou limitar o recrutamento de folículos primordiais na foliculogênese, reduzindo a capacidade de resposta folicular ao hormônio folículo

estimulante (FSH) e dessa forma, desempenhando um papel importante no processo de seleção folicular do crescimento até o estágio pré-ovulatório. (VISSER et al., 2006).

As concentrações circulantes deste hormônio podem ser utilizadas para prever a qualidade, o número de folículos disponíveis no ovário e o sucesso em biotecnologias reprodutivas, além de identificar um animal de alto valor genético, com capacidade de ser uma doadora de oócitos a partir 90 dias de idade e que apresentará uma alta capacidade reprodutiva quando atingir a idade a puberdade, isso reduziria os custos de reposição da cordeira e também identificaria animais menos férteis em uma idade jovem que permitiria sua venda. Portanto, os objetivos do presente estudo foram determinar as concentrações plasmáticas de AMH e avaliar sua relação com a resposta ovariana ao tratamento com gonadotrofinas, bem como, relacionar as concentrações séricas de AMH encontradas com a taxa de prenhez na primeira e segunda oportunidade de acasalamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre as concentrações plasmáticas do hormônio anti-mulleriano com a contagem folicular antral e presença da ovulação de cordeiras pré-púberes da raça White Dorper.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar precocemente fêmeas da raça White Dorper com maior capacidade de produção de cordeiros ao longo da vida reprodutiva;

Identificar a relação das concentrações séricas do hormônio anti-mulleriano com a taxa de prenhez de fêmeas ovinas em idade jovem;

3 HIPÓTESE

A hipótese estabelecida no presente estudo é a de predizer que as concentrações plasmáticas do hormônio anti-mulleriano (AMH) podem ser utilizadas como marcador de contagem folicular antral, ovulação e taxa de prenhez em fêmeas ovinas da raça White Dorper.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Identificação precoce da fertilidade de fêmeas ovinas jovens

A reprodução é um processo complexo e a seleção direta para características ligadas à geração de novos descendentes é, muitas vezes, difícil de ser aplicada tornando-se necessário identificar características reprodutivas que sejam facilmente medidas e que agreguem valor genético aos eventos reprodutivos.

Em regiões tropicais, a maioria dos programas de reprodução utilizam os traços de idade e peso como preditores de precocidade em machos e fêmeas. De fato, estas são variáveis importantes para o processo reprodutivo; entretanto, os valores ideais destas características apresentam alta variação intra e inter-raças (PASCAL et al., 2008). Em animais da raça Dorper, por exemplo, a puberdade é descrita por alguns autores (ZAVALA et al., 2008) acontecer a partir dos 213 dias de idade e com peso médio de 39 kg (CLOETE et al., 2000). Entretanto, cordeiras da raça Katahdin apresentaram sua primeira ovulação com idade média de 279 dias e cordeiras Pelibuey com 241 dias, isso representa uma diferença de 66 a 28 dias, respectivamente, aos animais Dorper (ROMERO et al., 2012).

Em fêmeas ovinas, as biotecnologias voltadas à reprodução estão em constante avanço para a determinação dos fatores ligados a precocidade sexual, através do uso de parâmetros morfológicos ovarianos e endócrinos. Embora seja altamente variável, estima-se que entre 857 a 1.363 folículos em crescimento e entre 113 a 494 folículos antrais estejam presentes no ovário de cordeiras logo após o nascimento, seguido do pico de crescimento folicular após a 4 semana de idade (MAHDI et al., 2008).

No entanto, resultados obtidos por BARTLEWSKI et al., (2002; 2006) mostram que as variações nos níveis circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) foram diretamente correlacionadas ao padrão de crescimento de folículos antrais ≥ 3 mm a partir da décima quarta semana de idade (pico de crescimento entre 16 e 24 semanas),ou seja, quando os folículos passaram a ser sensíveis às gonadotrofinas.

Em outro estudo realizado por RANTALA et al. (2014), foi possível determinar que embora as fêmeas ovinas tivessem a maior população de folículos

antrais, isto não se refletiu na idade e no peso a primeira ovulação e também não influenciou na taxa de ovulação no primeiro serviço e função do corpo lúteo (CL). Com base nas informações segundo o histórico reprodutivo de animais jovens, não houve diferença entre as taxas de ovulação do primeiro, do segundo e do terceiro ciclos do cio; entretanto, estudos relatam menor número de embriões viáveis em borregas durante seu primeiro ciclo, mas um aumento de 20% na fertilidade a partir do segundo serviço (IRELAND et al., 2011; KENYON et al., 2014).

No âmbito de um sistema de produção que visa maior fertilidade, nascimentos múltiplos e melhor crescimento do cordeiro, é importante o reconhecimento dos potenciais e limitações ambientais e nutricionais que se apresentam ao rebanho, e desta forma, diminuir o tempo para início do primeiro estro e aumentar a eficiência de produção. Portanto, pesquisas com objetivo de entender a regulamentação da secreção e biodisponibilidade de hormônios gonadotróficos e a interação complexa entre os fatores de identificação da precocidade de cordeiras podem ajudar a compreender este processo (BARTLEWSKI et al., 2011).

4.2 Fotoperíodo e Sazonalidade reprodutiva:

Os ovinos são animais sazonais, com ciclo anual de reprodução controlado pelo fotoperíodo, onde, o estímulo para a manifestação e/ou intensificação dos fenômenos reprodutivos é o decréscimo no número de horas de luz por dia (FONSECA, 2005). A estacionalidade reprodutiva é caracterizada por alterações comportamentais, endócrinas e ovulatórias reguladas através da altitude e latitude a que os animais são expostos. A estacionalidade é menos marcada em regiões próximas a linha do Equador, onde a duração das horas de luz e escuridão mais é homogênea (ROSA et al., 2003; CHEMINEAU et al., 2007).

O comportamento reprodutivo em fêmeas ovinas se restringe a uma época do ano em que se assegure o nascimento dos descendentes e que promova uma boa lactação às progenitoras (DODD et al., 2012). No entanto, o processo de domesticação e a seleção artificial têm reduzido o efeito da sazonalidade sobre a atividade gonadal de ovelhas, resultando em variações reprodutivas de raças (GOFF et al. 2013). As raças rústicas ou lanadas, como Ile de France, Suffolk e Merino, apresentam sazonalidade mais marcada quando comparadas com as

demais, Santa Inês e Morada Nova (deslanadas), por exemplo (LINCOLN et al., 2006).

Associado ao conceito de ritmicidade anual, dois períodos importantes devem ser abordados: o primeiro está relacionado à estação de reprodução, caracterizada pela sucessão em intervalos regulares (média de 17 dias; do final do verão ao início do inverno) de comportamento do estro e ovulação das ovelhas, no entanto, se a prenhez não se desenvolver, inicia-se uma estação de anestro (final do inverno ao início do verão) caracterizada pela cessação da atividade sexual (ROSA et al., 2003). Ambos os períodos são regulados pela glândula pineal, devido à secreção de melatonina.

A síntese e a secreção de melatonina ocorrem a um ritmo circadiano que envolve altos níveis sanguíneos durante a noite e níveis baixos durante o dia (CARCANGIU et al., 2005). Alterações na duração da secreção noturna de melatonina servem como mensageiro endócrino da estação, que auxilia no ajuste do estado neuroendócrino de animais sazonais (MURA et al., 2014). Estudos em que envolveram ovelhas pinectomizadas, foi demonstrado bloqueio da responsividade ao fotoperíodo, atrofia do hipotálamo e redução da secreção de melatonina, tendo como consequência a incapacidade de secreção do GnRH (HAZLERIGG, 2006). Por outro lado, uma associação importante na administração da melatonina na forma exógena com implantes de liberação lenta contínua em ovinos pinectomizados foi comprovada, uma vez que a partir da mimetização da liberação fisiológica deste hormônio foi possível favorecer o início da época de reprodução em ovelhas sazonais (LURIDIANA et al., 2015).

Contudo, a possibilidade de modificação da sazonalidade reprodutiva, estimulou o desenvolvimento de estudos que potencializem a reprodução de ovelhas através dos efeitos da administração hormonal exógena, com o objetivo de atender as leis de oferta e demanda do leite e da carne no mercado (ABECIA et al., 2012), através da melhoria dos índices reprodutivos como a taxa de fertilidade, taxa de prolificidade e o aumento do número de cordeiros destinados ao abate nos rebanhos comerciais refletindo diretamente na rentabilidade do criador.

4.3. Ciclo Estral

O ciclo estral representa a natureza cíclica da atividade ovariana após a puberdade, conferindo características funcionais e fenotípicas aos órgãos reprodutivos em resposta a ativação hormonal (GOODMAN et al., 2015). Na espécie ovina, o intervalo entre estros dura em média de 17 ± 3 dias, dividindo se em dois períodos, o primeiro chamado de fase lútea de 13 dias e o segundo, de fase folicular, que dura em média 4 dias (RUBIANES et al., 2000).

A atividade gonadal é um evento regulado através da secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o que implicará em um estímulo ao sistema portal hipofisário para a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Estes hormônios fornecem os mecanismos primários que controlam o crescimento folicular, de seleção e dominância através de mecanismos de realimentação na região hipotalâmica- hipofisária.

O FSH é o principal hormônio que controla o crescimento folicular em bovinos e ovinos; sua secreção é, por sua vez, controlada através dos principais produtos secretores do folículo dominante, estradiol e inibina A (BARTLEWSKI et al., 2015). Por outro lado, a secreção de LH desencadeia a luteinização das camadas celulares da parede folicular (granulosa e teca) e a ruptura do folículo ovulatório, resultando em ovulação e posterior formação do corpo lúteo (MORAES et al., 2002).

Sob estímulo do FSH, emergem grupos de folículos em tempos variáveis e de acordo com as ondas foliculares (FONSECA, 2005). Em ovinos, esse padrão de ondas tanto em raças prolíficas como não prolíficas, foi tipicamente caracterizado em 3 ou 4 ondas de emergência, demonstrando que houve um crescimento progressivo de folículos de uma classe de tamanho para outra ao longo de vários dias em forma ondulatória (EVANS et al., 2000; BARTLEWSKI et al., 2015). O conhecimento sobre o comportamento e dinâmica endócrina e fisiológica do ciclo estral permitem o desenvolvimento de alternativas e fatores que manipulem a puberdade e o ciclo reprodutivo de animais adultos, promovendo o controle do estro e da ovulação.

4.4 Foliculogênese

A foliculogênese é um processo de desenvolvimento folicular primordial que resulta no crescimento e diferenciação do oócito e células somáticas associadas, e

que progridem através dos estádios da mitose e da entrada na meiose durante a vida pré-natal (PALMA et al., 2012).

As fêmeas de todas as espécies domésticas apresentam um estoque finito de células germinativas, que é estabelecido na vida fetal e que depois será utilizado durante a vida reprodutiva adulta. Apesar de um vasto estoque folicular (100.000-200.000 em ovinos; mais de 200.000 folículos em bovinos) (BAKER et al., 1996) apenas 1% dessa população atinge a fase pré-ovulatória durante a vida reprodutiva, com a sua maioria sofrendo o processo de atresia (SCARAMUZZI et al., 2006).

A formação de folículos primordiais em ovinos, começa ainda na vida fetal em torno do dia 70 da gestação (GOODMAN et al., 2015), período no qual estes folículos começam a deixar o "*pool*" de reserva folicular (recrutamento inicial) através da ativação dos fatores parácrinos, que regulam e controlam este crescimento, e tendo como consequência alterações morfológicas estruturais devido a proliferação das células da granulosa e células da teca (MCGEE et al., 2000).

O crescimento do folículo é um processo durante o qual adquire progressivamente diferentes propriedades estruturais, cada uma das quais é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento futuro. A falha em adquirir essas propriedades no momento correto e em uma sequencia exata levará a deterioração do folículo através de atresia (CAMPBELL et al., 1995). Inicialmente, cada folículo primordial consiste em um oócito imaturo, rodeado por uma única camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso. Com o crescimento sequencial da camada de células da granulosa e da teca, os folículos poderão ser classificados em: primário (única camada de células da granulosa de formato cubóide), secundário (2-6 camadas de células da granulosa de formato cubóide) e terciário ou antral (>6 camadas de células da granulosa; diferenciação das células da teca e a formação do antro) (HUTT et al., 2006).

Os folículos permanecem estacionados na fase de prófase I da meiose devido ao elevado nível de estradiol presente na corrente sanguínea (CAMPBELL, 2007). Após a puberdade, os folículos passam a ser sensíveis à ação dos hormônios gonadotróficos devido a um aumento de receptores específicos em sua estrutura, promovendo os eventos endócrinos que levam à ciclicidade ovariana e

que são desencadeados a partir secreção do GnRH (FORTUNE et al., 2004; MIGAUD et al., 2016).

O hipotálamo com a secreção pulsátil de GnRH estimula a síntese e liberação de FSH e LH pela glândula hipófise anterior (PAWSON E MCNEILLY, 2005). Enquanto a secreção do LH é claramente pulsátil, o FSH é secretado na corrente sanguínea à medida que o hormônio é produzido (SARAIVA et al., 2010).O FSH controla o crescimento folicular através dos receptores presentes nas células da granulosa dos folículos ovarianos primários até o estágio pré-ovulatório (MCNATTY et al., 2000). Similarmente, na teca interna dos folículos, os receptores de LH contribuem para o desenvolvimento folicular através da ativação de enzimas esteroidogênicas (StAR e P450) que irão desencadear a síntese de androstenediona para a produção de estrógeno (MURAYAMA et al., 2012)

O estradiol exerce um "*feedback*" positivo no hipotálamo e na hipófise anterior, aumentando a frequência dos pulsos de GnRH, e estimulando a proliferação das células da granulosa, modulando sua diferenciação pelo aumento na habilidade do FSH em induzir a expressão de receptores para LH (QUIRK et al., 2004). A partir do estabelecimento dos receptores de LH nas células da granulosa, o folículo dominante (6-7 mm em ovelhas e 15-20 mm em vacas; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005) passa a secretar alto nível de estrógeno, fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF) e inibina A, reduzindo o nível de FSH circulante (HUTT et al., 2006).

Estudos em bovinos comprovam a ação do LH na fase final da maturação folicular, onde os folículos não cresceram além de 7-9 mm quando a secreção de LH foi suprimida (GONG et al., 1995). Portanto, os folículos menores (futuros subordinados) não atingiram um estágio compatível com resposta semelhante às gonadotrofinas. Esta ação refere-se aos fatores intra-foliculares que representam uma resposta relativamente maior do futuro folículo dominante ao LH e ao baixo FSH (GINTHER et al., 2003). Finalmente, o folículo dominante poderá ovular sob a influência do pico pré-ovulatório de LH (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Após a ovulação, o folículo se transforma em corpo lúteo (CL), a sua composição é baseada na transformação das células da granulosa e da teca em grandes células esteroidogênicas e pequenas células luteais, consiste também de fibroblastos, células musculares lisas e células imunológicas (SCHAMS et al., 2002). O CL torna-se ricamente vascularizado e serve como local de produção de

progesterona durante a fase lútea do ciclo. Entretanto, se o oócito não for fertilizado, o corpo lúteo sofre luteólise através da ação da prostaglandina F2-α e assim, permitirá o inicio de um novo ciclo reprodutivo (SCHAMS et al., 2004).

4.5 Indução a puberdade de fêmeas

A reprodução de pequenos ruminantes pode ser controlada por vários métodos desenvolvidos nas últimas décadas. Alguns destes envolvem a administração de exógena de hormônios que modificam a cadeia fisiológica dos eventos envolvidos no ciclo sexual. Outros, não incluem hormônios, mas apenas métodos naturais, como o controle da luz ou a exposição ao macho (ABECIA et al., 2015).

Quando se trata do ponto de vista neuroendócrino, a teoria “gonadostática” clássica sugere que a puberdade é a reativação do sistema hipotalâmico - hipofisário, levando a uma diminuição da sensibilidade ao “feedback” negativo do estradiol e permitindo um aumento da liberação pulsátil de GnRH, a atividade gonadal e a ovulação (EBLING, 2005). Esta teoria foi testada em fêmeas bovinas, onde a concentração fisiológica de estradiol exógeno suprimiu a secreção de LH, atrasando o início da puberdade em 4, 8 e 12 meses de idade (CARDOSO NOGUEIRA et al., 2009).

Acredita-se que outro fator chave para o estabelecimento da puberdade é um aumento na libertação de LH pela hipófise, que atinge seu pico próximo aos 3-4 meses de idade, em resposta à secreção do GnRH pelo hipotálamo (EVANS , 2003). O tratamento de bezerras com GnRH entre 4 e 8 semanas de idade elevou transitoriamente a secreção endógena das concentrações e frequência de LH, reduzindo a idade a puberdade em pelo menos 6 semanas (MADGWICK et al., 2005). Entretanto, em estudo anterior, o tratamento com LH entre 8 e 12 semanas de idade, teve um efeito prejudicial sobre o crescimento folicular e não reduziu a idade na puberdade (EVANS, 2003).

Por esta razão, os tratamentos farmacológicos destinados a induzir a ovulação, representam uma alternativa importante para superar as limitações da fisiologia reprodutiva, melhorar o ganho genético e potencial de produção, entretanto devem ser empregados nas doses e idade corretas, visando o aumento

do número e tamanho dos folículos ovarianos viáveis para a reprodução (NÚNEZ-OLIVEIRA et al., 2014).

Um dos hormônios amplamente utilizados para melhorar a fertilidade ovina é a gonadotrofina coriônica equina (eCG), pois é uma ferramenta importante para acelerar o mecanismo do crescimento e desenvolvimento folicular (BARRETT et al., 2004, ALI, 2007), através da expressão de atividade de FSH (70%) e LH (30%) em espécies não equídeas. Embora o princípio ativo deste hormônio ainda não seja completamente compreendido, a justificativa cabível é que a dupla atividade é baseada na afinidade estrutural de eCG a receptores de LH e de FSH nas células da granulosa ou células da teca de ruminantes, gerando efeitos importantes relacionados a alterações no sistema folicular, padrão de crescimento, função lútea e aumento da fertilidade (MURPHY, 2012).

Os resultados obtidos por SAWALHA et al., (2011) mostraram que cordeiras pré-púberes sem o eCG resultou na necessidade de um tempo maior para expressar comportamento estral quando comparado ao grupo tratado, onde a expressão de estro aconteceu em menor tempo e em 82% dos animais.

A fase lútea após a primeira ovulação em cordeiras é geralmente de curta duração (FOSTER, 2016), e em decorrência disso, métodos artificiais que utilizam progesterona ou seus análogos foram testados (BARUSELLI et al., 2004). DAY et al. (1998)..Os primeiros tratamentos consistiram em 14 doses subcutâneas injeções de 10 mg de progesterona, em 2 mL de óleo de milho, no qual reduziu o intervalo de estro dos animais para 8 dias (DUTT e CASIDA, 1948). Sugeriu se, portanto, que este tratamento fosse usado no anestro sazonal com o objetivo mimetizar progesterona natural produzida pelo corpo lúteo (CL) após a ovulação (ABECIA et al., 2012), sincronizar a onda folicular alterando a frequência de pulso e o desenvolvimento folicular (AMIRIDIS et al., 2012) e consequentemente,prolongando a vida útil do CL e favorecendo a indução à puberdade (SÁ FILHO et al., 2005).

4.6 Hormônio Anti- Mulleriano

O hormônio anti-Mulleriano (AMH) é uma glicoproteína dimérica, membro da superfamília do fator de crescimento transformante-β (JOST, 1946; CATE et al., 1986), que atua no crescimento e na diferenciação dos tecidos (MARCA et al.,

2010). Seu papel está claramente definido no sexo masculino, onde o AMH é produzido por células de Sertoli fetal no momento da diferenciação testicular, e induz regressão dos ductos de Muller (MARCA et al., 2009); entretanto, sua ação em fêmeas não é totalmente esclarecida.

Em fêmeas, a secreção é provavelmente modulada pelo grau de desenvolvimento folicular, uma vez que passa de níveis pouco detectáveis ao nascimento (RAJPERT-DE MEYTS et al., 1999) para altos no período pré-puberal (HUDSON et al., 1990). Além disso, o estágio de crescimento folicular é susceptível de influenciar a expressão da AMH, principalmente nas fases pré-antral e antral.

Há fortes evidencias de que o papel do AMH seja expresso na foliculogenese ovariana inicial e continua a ser observada durante o crescimento folicular até o ponto de recrutamento cíclico (GRUIJTERS et al.,2003). Em contrapartida, estudos com ovários camundongos revelam que o AMH inibe o recrutamento de folículos (regulando a saída do “pool” folicular antral) e através da redução a sensibilidade ao FSH (CAMPBELL et al., 2012).

Estudos de DURLINGER et al. (2002) confirmaram esta hipótese a partir da avaliação dos ovários de ratas cultivados “*in vitro”* durante 2 ou 4 dias na ausência ou presença de AMH. Nos ovários das ratas de 2 dias de idade tratadas com AMH, foi possível observar a predominância de folículos primordiais e alguns ovócitos, mas não a presença de folículos crescentes e, portanto, verificou-se a influência do AMH sob o controle do recrutamento de folículos primordiais e uma diminuição de 40-50% no número de folículos após 2 e 4 dias de cultivo.

As concentrações circulantes deste hormônio podem ser utilizadas para prever o número de folículos disponíveis no ovário e o sucesso em biotecnologias reprodutivas, incluindo a resposta a protocolos de estimulação hormonal, produção de embrião “in vitro” e transferência de embriões em humanos (BATISTA et al., 2015; RICO et al., 2012), bovinos (SOUZA et al., 2014; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2015), ovinos (LAHOZ et al., 2012), caprinos (MONNIAUX et al., 2011) e éguas (VERNUNFT et al., 2011). Em vacas, a concentração plasmática de AMH está altamente correlacionada com o número de folículos antrais de 3 a 7 mm de diâmetro, que são os alvos principais de tratamentos superovulatórios (RICO et al., 2009). Também, a medida de AMH pode ajudar a predizer a capacidade de indivíduos em produzir maior ou menor número de embriões após a superovulação,

uma característica repetível e possivelmente herdável em bovinos (MONNIAUX et al., 2010).

Resultados similares foram reportados em éguas, indicando que o AMH poderia ser um preditor do número de folículos disponíveis para um programa de aspiração folicular (VERNUNFT et al., 2011). Em ovinos, resultados da pesquisa com a raça Aragonesa apontam que a mensuração da concentração plasmática do AMH pode ser usada para selecionar, em idades precoces, cordeiras com alta fertilidade na primeira estação de monta (LAHOZ et al., 2012).

Há também relatos de estudos clínicos no contexto de tratamento da infertilidade anovulatória em humanos, que estabeleceram também que o AMH é um marcador útil no diagnóstico e prognóstico na infertilidade e desordens reprodutivas como a síndrome do ovário policístico (PIGNY et al., 2003) e insuficiência ovariana primária (POI) (VISSER et al., 2012). Neste contexto, é importante ressaltar que as concentrações sanguíneas AMH estão provavelmente relacionadas com alta expressão em todos os folículos em crescimento (MONNIAUX et al., 2010).

Destaque-se, portanto, a importância na determinação das concentrações séricas de AMH em animais da raça White Dorper, como forma de identificar animais com maior capacidade reprodutiva, bem como, instigar a pesquisas nessa área que venham a contribuir para a padronização e alcançar valores de referência das concentrações de AMH para os critérios de seleção para fêmeas ovinas.

4.7 Referências Bibliográficas

ABECIA J.A., FORCADA, F., GONZÁLEZ-BULNES, A., Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p. 173–179, 2012.

ALI, A., S. FAHMY. Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (*Bubalus bubalis*) during Ovsynch program, **Theriogenology**, v. 68, p. 23–28, 2007.

BAKER, J., HARDY, M.P., ZHOU, J., BONDY, C., LUPU, F., BELLVÉ, A.R., EFSTRATIADIS, A., Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction, **Molecular Endocrinology**, v.10, p. 903–918, 1996.

BARRETT, D.M.W., BARTLEWSKI, P.M., BATISTA-ARTEAGA, SYMINGTON, M., A., RAWLINGS, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen

releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes, **Theriogenology**, v. 61, p. 311–327, 2004.

BARTLEWSKI, P.M., BABY, T.E., GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep, **Animal Reproduction Science**, v.124, p. 259-268, 2011.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs, **Small Ruminant Research**, v.43, p. 37–44, 2002.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs, **Small Ruminant Research**, v.63, p.189–198, 2006.

BARTLEWSKI, P.M.,SEATON,P, OLIVEIRA, M.E.F., KRIDLI, R.T, MURAWSKI, M., SCHWARZ, TOMASZ, Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow, **Theriogenology**, v.86, p. 1–14, 2016.

BATISTA, E.O.S., GUERREIRO, B. M, FREITAS, B.G. SILVA, J.C.B., VIEIRA, L.M., FERREIRA, R.M., REZENDE 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**, v. 54, p. 1–9, 2016.

CAMPBELL, B. K., CLINTON, M., WEBB, R. The role of anti-müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory Species (Sheep), **Endocrinology**, v.153, p. 4533-4543, 2012.

CAMPBELL, B., SCARAMUZZI, R., WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle, **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p. 335–350, 1995.

CAMPBELL, B.K., BAIRD, D.T. Inhibin-A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulose cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep, **Journal Endocrinology**, v.169, p. 333–345, 2001.

CAMPBELL, R.E, HERBISON A.E. Definition of brainstem afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in the mouse using conditional viral tract tracing, **Endocrinology**, v.148, p. 5884–5890, 2007.

CARCANGIU, V. , VACCA, G.M., PARMEGGIANI, A., MURA, M.C., BINI, P.P. , Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does, **Small Ruminant Research**, v. 59, p. 7–13, 2005.

CARDOSO D.; NOGUEIRA, G.P.Mecanismo neuriendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia**. v.10, p.59-67, 2007.

CATE, R.L., MATTALIANO, R.J., HESSION, C., TIZARD, R., FARBER, N.M., CHEUNG, A., Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells, **Cell**, v. 45, p. 685–698, 1986.

CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., BRILLARD, J.P., FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals, **Animal**, v.3, p.419–432, 2007.

CLOETE, S.W.P., SNYMAN, M. A., HERSELMAN, M. J. Productive performance of Dorper sheep, **Small Ruminant Research**, v.36, p.119-135, 2000.

DODD, C.L., PITCHFORDA, W. S., EDWARDS, J. E. H., HAZEL, S.J., Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A review, **Applied Animal Behaviour Science**, v.140, p. 1– 15, 2012.

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

DURLINGER, A.L. L., GRUIJTERS, M.J. G., KRAMER, P., KARELS, B., RAJENDRA KUMAR, T. MATZUK, M. M., ROSE, U.M., JONG , F.H., UILENBROEK, J.T. J.GROOTEGOED, J. A., THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary, **Endocrinology**, v.142, p. 4891-4899, 2001.

EBLING, F. J. P. The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction**. v.129, p. 675–683, 2005.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals.Reproduction Domestic Animal. v. 38, p.240-246, 2003.

EVANS, A.C.O.; DUFFY, P.; HYNES, N., BOLAND, M.P.; Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**. v.53, p. 699–715, 2000.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, GO, Anais: Palestras, 2005.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**. v. 82, p.109–126, 2004.

GINTHER, M.A. BEG, F.X. DONADEU, D.R. BERGFELT, Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. v. 78, p.239–257, 2003.

GOFF, K. J., KNIGHT, J. W., PELZER, K. D. , AKERS, R. M., NOTTER, D. R. Circannual changes in progesterone secretion in intact ewes, luteinizing hormone secretion in ovariectomized estradiol-implanted ewes, and prolactin secretion in

three sheep breeds anticipated to differ in seasonality of reproduction. **Animal reproduction Science**. v. 138, p. 194–202, 2013.

GONG, J.G., CAMPBELL**,** B.K. BRAMLEY, T.A. Treatment with recombinant bovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles in ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 41, p. 13-26, 1996.

GOODMAN, R.L., INSKEEP K., Control of the Ovarian Cycle of the Sheep-cap 27. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction** (Fourth Edition), p. 1259-1305, 2015.

GRUIJTERS, M.J., VISSER, J.A., DURLINGER, A.L., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 211, p.85–90, 2003.

HAZLERIGG, D.G., WAGNER, G.C. Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. **Trends Endocrinology Metabolism**. v.17, p. 83–91, 2006.

HAZLERIGG, G., GABRIELA C.; WAGNER G.. **Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude**. v.17, p.83–91, 2006.

HUDSON, P.L.; DOUGAS, I., DONAHOE; P.K., CATE, R.L.; EPSTEIN, J.; PEPINSKY, R.B.; MACLAUGHLIN, D.T. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.70, p.16–22, 1990.

HUTT, K.; MCLAUGHLIN E.; HOLLAND M. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Molecular Human Reproduction**. v.12, p. 61– 69, 2006.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.. IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of AMH as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction Fertility Development**. v.23, p.1-14, 2011.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN,R. J.; FERRIS, T. ; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal Dairy Science**. v.98, p.1–10, 2015.

KENYON, P. R. et al. Review of sheep body condition in relation to production characteristics.**New Zealand Journal of Agricultural Research**. v. 57, p. 38– 64, 2014.

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

LA MARCA, A., BROEKMANS, F.J., VOLPE, A., FAUSER, B.C., MACKLON, N.S. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? **Human Reproduction**. v. 24, p. 2264–2275, 2009.

LA MARCA, A., SIGHINOLFI, G., RADI, D., ARGENTO, C., BARALDI, E., CARDUCCI ARTENISIO, A., STABILE, G. E VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Human Reproduction**. v. 16, p. 113–130, 2010.

LAHOZ, B., ALABART, J.L., MONNIAUX, D., MERMILLOD, P., FOLCH, J. Anti-Mullerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. **Biomedcentral Veterinary Research**. v.8, p.1746-6148, 2012.

LINCOLN G.A, CLARKE I.J, HUT R.A, HAZLERIGG D.G. Characterizing a mammalian circannual pacemaker. **Science**. v.314, p.1941–4, 2006.

LURIDIANA, S. , MURA, M.C. ,DAGA, C. ,DIAZ, M.L. ,BINI, P.P. ,COSSO, G. ,CARCANGIU, V. The relationship between melatonin receptor 1A gene (MTNR1A) polymorphism and reproductive performance in Sarda breed sheep. **Livestock Science**. v.171, p. 78–83, 2015.

MADGWICK, S.; EVANS, A.C.O.; BEARD, A.P. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. **Theriogenology**. v. 63, p. 2323–2333, 2005.

MAHDI, D., KHALLILI, K. Relationship between follicle growth and circulating gonadotropin levels during postnatal development of sheep. **Animal Reprodution Science**. v.106, p.100-112, 2008.

MCCAFFERY, F.H., LEASK, R., RILEY, S.C., TELFER, E.E., Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 267–273, 2000.

MCGEE, E.A., CHUN, S.-Y., LAI, S., HE, Y.-E., HSUEH, A.J.W., Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. **Fertility and Sterility**. v.71, p. 732–738, 1999.

MCNATTY, K.P., FIDLER, A.E , JUENGEL, J.L., QUIRKE, L.D , SMITH, P.R , HEATH, D.A , LUNDY, T., O'CONNELL, A, TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.11–20, 2000.

MIGAUD M. ; BUTRUILLE L. ; DUITTOZ, A.; PILLON, D. ; BATAILLER, M. Adult neurogenesis and reproductive functions in mammals. **Theriogenology** . v.86, p. 313–323, 2016.

MONNIAUX, D.; BARBEY, S.; RICO, C.; FABRE, S.; GALLARD, Y.; LARROQUE, H. Anti-Mullerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? **Reprodution Fertility Development**. v.22, p.1083–1091, 2010.

MONNIAUX, D.; BARIL G.; LAINE, A.L.; JARRIER, P.; POULIN N.; COGNIE J.; FABRE S. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**. v.142, p. 845–854, 2011.

MORAES, J. C. F., SOUZA, C. J. H., GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, p.25-35, 2002.

MURA, M.C., LURIDIANA, S., BODANO, S., DAGA, C., COSSO, G., DIAZ, M.L., BINI, P.P.V. Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms onseasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. **Animal Reproduction Science**. v.149, p.173–177, 2014.

MURAYAMA C., MIYAZAKI H., MIYAMOTO, A., SHIMIZU, T. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 350, p. 1–9, 2012.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**. v.9, p.223-230, 2012.

NÚNEZ-OLIVERA R., CASTRO, T., GARCÍA-PINTOSA, C., BÓB, G., PIAGGIOD, J., MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol'based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**. v.146, p.111-6, 2014.

PALMA, G. A., ARGAÑARAZ, M. E., BARRERA, A.D, RODLER, D., MUTTO, A.A., SINOWATZ, F. Biology and biotechnology of follicle development. **Scientific World Journal**. p. 938-138, 2012.

PASCAL, C., IVANCIA, M., GILCA,I., NACU G., MACIUC, V., Researches regarding meat quality in young sheep from the Romanian local breed, International Symposium, **Anais**, 2008.

PAWSON, A. J., MCNEILLY, A. S. , The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**. v.88, p. 75–94, 2005.

PIGNY, P.; MERLEN, E.; ROBERT, Y.; CORTET-RUDELLI, C.; DECANTER, C., JONARD, S.; DEWAILLY, D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, p. 5957-5962, 2003.

QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.L.; PORTER, D.A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. **Journal of Animal Science**, v.82, p. 40-52, 2004.

RAJPERT-DE MEYTS, E., JORGENSEN, N., GRAE, 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, **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,** v.84, p. 3836-3844, 1999.

RANTALA, M. H.; TAPONEN, J., LH secretion around induced ovulation during early and late diestrus and its effect on the appearance of short estrous cycles in cyclic dairy heifers.**Theriogenology** . v.83, p.1–7, 2014.

RAWLINGS, N.C.; BARTLEWSKI, P.M - **Clinical reproductive physiology of ewes**. Youngquest, RS, Threlfall, (2nd Eds.), 2007.

RICO, C.; DROUILHET L.; SALVETTI, P.; DALBIES-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZE, J.L.; PILLET E.; PONSART, C.; FABRE S.; MONNIAUX, D. Determination of anti-Mullerian 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**. v. 24, p.932-44, 2012.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M;, TOUZÉ, J.L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; BENOÎT, R.; 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 Reprodution**. v.80, p.50–59, 2009.

ROMERO,R.A.A.; FRANCO, J.A.Q.; SANCHEZ,D.H.; TORRES,T.S.; AMEZCUA, E.V.; UGALDE,J.R.; RODRIGUEZ,J.B.; QUINTERO, R.B.; CASTILLO, J.G.C. Ovarian activity in F1 prepubertal ewe lambs under tropical conditions. **Livestock Science**. v. 143, p.24–28, 2012.

ROSA, H.J.D, BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**. v. 48, p.155–171, 2003.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reprodutiva em cabras y ovejas. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. São Paulo. **Anais,** São Paulo: FMVZ-UNESP-USP, p.255-282. 2000.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogenese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SÁ FILHO, M.F.; TORRES- JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADOC, L. L.;, GIMENES, U.; FERREIRA, R.M.; AYRESA, H.; CASTRO, PAULA, L.A.; SALESA, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Animal Reproduction Science**. v. 118, p.182–187, 2010.

SAWALHA, M.N.; KRIDLI, R.T.; JAWASREH, K.I.; MEZA-HERRERA, C.A. The use of melatonin and progestagen–eCG to initiate reproductive activity in prepuberal Awassi ewe lambs. **Tropical Animal Health Production**. v.43, p.1345–1350, 2011.

SCARAMUZZI, R.; CAMPBELL, B.; DOWNING, J.; KENDALL, N.; KHALID, M., MUNOZ-GUTIERREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**. v. 46, p. 339–354, 2006.

SCHAMS, D.; BERISHA B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction Domestic Animal**. v.39, p.241–251, 2004.

SCHILLO, K. K.; DIERSCHKE, D. J.;HAUSER, E. R. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: Increased threshold to negative feedback action of estradiol.**Journal of Animal Science**. v.54, p. 325-336, 1982.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Sciencie**. v.98, p.169–178, 2015.

TOELLE, V.D.; ROBISON, O.W. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. **Journal Animal Sciencie**. v.60, p.89-100, 1985.

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

VERNUNFT, A.;SCHNEIDER, F.; KANITZ, W. Anti-Muellerian Hormone (AMH) can help to predict follicular growth in mares. **Reprodution Domestic Animal**. v.46, p.44, 2011.

VISSER, J.A.; DE JONG, F.H.; LAVEN, J.S.; THEMMEN, A.P. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**. v.131, p.1-9, 2006.

VISSER, J. A.; THEMMEN, A.P.N. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. **Molecular and Cellular Endocrinology**.v. 382 , p. 460–465, 2012.

ZAVALA, R. E.; ORTIZ, J. R.; UGALDE, O.J. P.R; MORALES, P. M.; VÁSQUEZ, A. S.; GARCÍA, J.R.S. Pubertad en hembras de cinco razas ovinas de pelo e condiciones de trópico seco. **Zootecnia Tropical**.v. 26, p. 465-473, 2008.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado de acordo com os princípios estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPR) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, de acordo com o protocolo de aprovação 072/2015.

Local

O estudo foi conduzido no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (LAPOC), da Fazenda Experimental do Canguiri, pertencente à Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado no município de Pinhais (25º25' S; 49º8' W, 915 m altitude), Paraná, Brasil. O período experimental foi entre junho de 2015 a dezembro de 2016.

Desenvolvimento

Inicialmente, 23 ovelhas da raça White Dorper, com peso médio de 67±17 kg e idade média de 4±1,3 anos, foram submetidas a um protocolo hormonal, em fase aleatória do ciclo estral (dia 0). Cada ovelha foi sincronizada com a utilização 33 mg de progesterona impregnados em dispositivos intravaginais (CIDR®, Pfizer, Brasil), por 7 dias. Imediatamente após a remoção do implante, todos os animais receberam 0,263 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio® – Ouro Fino, Brasil), intramuscular. Em seguida, dois reprodutores com histórico reprodutivo previamente conhecido, tiveram a região torácica ventral pintada com tinta, para marcar a garupa das fêmeas que foram copuladas, e posteriormente, foram introduzidos no lote de ovelhas. A observação do estro foi monitorada duas vezes ao dia, durante 45 dias. Passados 30 dias após o fim da estação de monta, foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal (Landwind® C40 Vet, China) e transdutor linear retal de 7,5 MHz.

Após o nascimento, as cordeiras foram submetidas ao manejo sanitário com vacinas para: clostridioses, linfadenite caseosa e ectima contagioso (Sintoxan 9$^{th®}$, Merial; Linfovac®, Vencofarma; Ectisan®, Ceva; Brasil, respectivamente). Para as infecções parasitárias nas cordeiras foi utilizado o antiparasitário a base de monepantel (Zolvix®, Elanco, Brasil), e foram vermifugados apenas animais que apresentavam mucosa ocular hipocorada entre os graus 3 a 5, como o especificado pelo método Famacha (VAN WYK, 1997). O manejo nutricional foi realizado com

suplementação concentrada em *creep-feeding* (18% de Proteína Bruta) desde 15 (11 ± 2,7 kg) até 60 dias de idade (19 ± 3,5 kg).

O lote de cordeiras foi mantido com suas mães até os 60 dias de idade e após essa idade quando ocorreu o desmame, permaneceram em pastagem perene de capim Tifton-85 (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85) com sobressemeadura de aveia preta (*Avena strigosa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), com acesso a água e sal mineral *ad libitum* até o fim do experimento. A suplementação concentrada para as cordeiras visaram atender as exigências nutricionais preconizadas pelo NRC (2007). .

Foram avaliadas 37 cordeiras da raça White Dorper, as quais possuíam em média 92 ± 6 dias de idade ao início das avaliações, pesando 27 ± 2 kg e escore de condição corporal (ECC) 3 ± 0,4 (RUSSEL et al., 1969). Os animais foram identificados individualmente com brincos auriculares numerados ao nascimento e pesados a cada 30 dias, durante todo o período experimental. Para testar a sensibilidade dos folículos a gonadotrofinas em idade pré-púbere, as cordeiras foram avaliadas aos 120, 150, 180 dias de idade. Foi administrada dose de 600 UI (LAHOZ et al., 2012) de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon®, Zoetis, Brasil), intramuscular. Após 6 dias da indução hormonal, as fêmeas foram submetidas a uma avaliação única dos ovários, realizada por laparoscopia, com objetivo de monitorar a contagem de folículos antrais e ovulação.

Para mensuração do hormônio anti-mulleriano, foi colhido sangue diretamente por punção da veia jungular, usando tubos vacutainer heparinizados de 5 mL, a partir dos 90 dias de idade das cordeiras. Imediatamente após a coleta; o sangue foi centrifugado a 2100 g por 25 minutos a temperatura de 10º C, e transferido o plasma para microtubos tipo Eppendorf e armazenados a temperatura -20º C até o momento da análise do AMH (kit ELISA MIS/AMH – Beckman Coulter), que foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, em Curitiba - Paraná.

Laparoscopia

A laparoscopia foi realizada para determinar o número de folículos antrais presentes no ovário após a estimulação por eCG, aos 120, 150, 180 dias de idade das cordeiras. Após jejum de 12 horas, os animais receberam como medicação pré-anestésica 0,2 mg/kg/IV de cloridrato de acepromazina a 1% (Acepran®, Vetnil, Brasil). Transcorridos 5 minutos, foram colocados em mesa cirúrgica, onde foi realizada a tricotomia da região pélvica ventral, antissepsia com álcool absoluto e iodopolvidine alcoólico, seguida da anestesia local infiltrativa com cloridrato de lidocaína a 2% (Xylestesin®, Cristália, Brasil) 5 ml em cada ponto, onde pequenas incisões, de 2 a 3 cm de comprimento eram feitas na parede abdominal da região pélvica ventral.

A primeira incisão foi feita aproximadamente 4,0 cm lateralmente a linha média do lado direito, próximo à glândula mamária, de forma que o primeiro trocater fosse inserido e para que a óptica fosse introduzida. Uma segunda incisão foi realizada no lado oposto à primeira, para que a pinça de apreensão ovariana fosse inserida. Posteriormente, o abdômen foi insuflado com ar causando distensão da cavidade abdominal, facilitando a manipulação das ferramentas e visualização das estruturas reprodutivas.

Ao fim do procedimento, foi realizada a sutura da musculatura com ponto simples separado (Categute 2-0; Bioline - Brasil), a sutura da pele foi realizada com padrão Sultan e mononáilon 2-0 (Bioline-Brasil). Em cada animal foi administrado flunexim meglumine (Desflan®, Ouro Fino, Brasil) 2,2 mg/kg/IM como antiflamatório e analgésico, spray com antibiótico tópico (Bactovet®, Konig, Brasil) e pomada repelente (Unguento Pearson®, Eurofarma, Brasil) em cada uma das suturas, foi realizada antibioticoterapia sistêmica com penicilina na dose de 30.000 UI/kg (Pencivet plus®, Intervet, Brasil), intramuscular. Ao fim do procedimento, os animais foram retirados da maca cirúrgica e monitorados até o restabelecimento completo.

Figura 1 - Principais etapas do procedimento de laparoscopia; A = anestesia infiltrativa local; B = Trocater da óptica; C = localização das estruturas; D = ovulação.

Estação de monta

Quando as cordeiras (*n*=19) nascidas em julho de 2015 completaram 12 meses de idade, foram novamente pesadas e o escore de condição corporal foi avaliado. Posteriormente, para a indução de cio foi utilizado 33 mg de progesterona impregnados em dispositivos intravaginais (CIDR®, Pfizer, Brasil), por 7 dias, e após a remoção do implante, todos os animais receberam 0,263 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio® – Ouro Fino, Brasil). Em seguida, os animais foram divididos em dois lotes e um reprodutor com fertilidade comprovada da raça White Dorper, foi inserido em cada lote.

A estação de monta teve duração de 25 dias consecutivos, com registro diário sobre as fêmeas que foram copuladas pelo macho nas últimas 24 horas. Os reprodutores tiveram o peito pintado com tinta especial para marcar a garupa das fêmeas que forem montadas. Passados 30 dias do término da estação de monta, foi realizado o diagnóstico de gestação com equipamento de ultrassonografia pela via transretal com transdutor de 7,5 MHz. Foi calculada a taxa de taxa de prenhez do rebanho, pela relação entre as fêmeas expostas à monta e as fêmeas que foram confirmadas prenhas pela ultrassonografia.

Hormônio Anti-Mulleriano

A coleta do sangue foi realizada em tubos de heparina (vacuntainer – BD, 5ml) tomando as precauções habituais para a punção venosa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2100 g por 25 minutos a temperatura de 10º C, e transferido o plasma para microtubos tipo eppendorf e armazenados a temperatura -20º C até o momento da análise do AMH (Kit ELISA MIS/AMH – Beckman Coulter).

As 148 amostras de plasma foram descongeladas e homogeneizadas, e em seguida foram submetidas à centrifugação durante 5 minutos em 6000 x g. Uma vez centrifugadas, as alíquotas foram distribuídas em tubos de poliestireno (12 x 75 mm) de 5 ml. Antes de adicionar a microplaca AMH Gen II ELISA, todos os calibradores, controles, amostras e o AMH Gen II (tampão de ensaio) foram preparados, utilizando a metodologia descrita no kit.

As alíquotas separadas foram adicionadas (50µl) aos poços de microtitulação de AMH concomitantemente a alíquota padrão (50µl) e controle (50µl), seguidamente, o 100 µl AMH Gen II “Assay Buffer” - EDTA de dissódico também foi adicionado, as amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C na presença do anticorpo primário, depois durante 1,5 h à temperatura ambiente, na presença do secundário.

Posteriormente, os poços foram aspirados e lavados cinco vezes utilizando lavadora automática e invertendo a placa sobre material absorvente. Após este processo, 100 µl do anticorpo de biotina conjugada foi adicionada, e a placa permaneceu durante uma hora e meia em temperatura ambiente e em constante agitação. Uma nova lavagem foi realizada para que 100 µl da enzima estreptavidina conjugada pudesse ser adicionada, mantendo a placa novamente em agitação por trinta minutos. Uma terceira lavagem foi feita e a placa permaneceu durante quinze minutos em temperatura ambiente e constante agitação.

A solução de “parada (*stop solution*)” foi adicionada para que a leitura da placa fosse realizada em espectrofotômetro (450 nm e 630 nm) e posterior, cálculo da absorbância e ajuste da curva “fit” da média para cada calibrador, controle e amostra.

O coeficiente de variação inter-ensaios foi de 4,16% e intra ensaios 3,57%, 4,62% e 4,29%.

Figura 2- Procedimentos para análise de AMH; A = divisão das alíquotas; B = deposição das amostras na placa; C = processo de lavagem (LT-3500 – Lab Tec); D = Leitora de microplacas (Synerge HT – Biotek);

Análise Estatística

A normalidade dos resíduos foi testada pelo teste de Shapiro Willk, aplicando uma correção para amostras finitas. Para determinar a significância dos dados não paramétricos (produção de folículos antrais, ovulação, concentrações de AMH) foi utilizado o teste de Kruskall Wallis.

As correlações entre as variáveis como: ocorrência de ovulação (1 = ovulação, 0 = não ovulação), número de ovulações, concentração plasmática de AMH, idade, peso vivo, foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Para as variáveis contínuas: peso vivo, concentração plasmática de AMH, ganho de peso médio diário foram testadas por análise de variância (ANOVA).

Como a concentração plasmática de AMH não seguiu os padrões de normalidade dos resíduos e homogeneidade, seus valores (pg/mL) foram transformados em logaritmos decimais (log10 [AMH + 1]) antes da ANOVA, e embora a significância mostrada nas tabelas e gráficos fosse obtida através dos dados transformados, os dados originais (não transformados) são os apresentados. No caso, de variáveis dicotômicas, apresentadas como porcentagens (%) em texto

e tabelas, foram analisadas por qui-quadrado. Para comparações entre os pares de médias foi utilizada a ANOVA.

Os dados foram processados utilizando o software Statistica versão 7.1.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações plasmáticas de AMH foram mensuradas em 30 das 37 cordeiras avaliadas (78%; 90 dias *n*=33; 120 dias *n*=34; 150 dias *n*=34; 180 dias *n*=36). Os valores foram determinados durante o período pré-puberal após a estimulação hormonal por eCG, conferindo uma avaliação padronizada e repetida. As concentrações observadas confirmam a existência de uma variabilidade interindividual, com resultados 0,00 a 655 pg/ml em fêmeas ovinas da raça White Dorper. Considerando este comportamento, acredita se que há uma diferença no número de folículos antrais responsivos a gonadotrofina entre os animais nessa idade, visto que as concentrações plasmáticas de AMH podem ser influenciadas pelo *pool* de reserva folicular ovariana formado no período embrionário, bem como outros fatores genéticos individuais, secreção de FSH, presença da ovulação e número de ovulações (RICO et al., 2009, 2011; ; MONNIAUX et al., 2011; CAMPBELL et al., 2012; MONNIAUX et al., 2013,;).

Foi possível observar que os níveis plasmáticos de AMH corresponderam em média 60±27 pg/ml aos 90 dias de idade e que curiosamente permaneceram inalteradas (P>0,05) nas idades subsequentes (120,150 e 180 dias; Figura 3), indicando que na idade pré-puberal essas características podem ser expressas continuamente por longo prazo. Esta é informação importante quanto a viabilidade econômica para a repetição das dosagens, pois, o custo que envolve a compra do kit para a determinação das concentrações e administração exógena do hormônio são relativamente altos o que poderia inviabilizar a prática. Contudo, os trabalhos publicados em ruminantes que utilizam uma única dosagem conseguem prever com precisão a capacidade reprodutiva individual (RICO et al., 2009; TORRES-ROVIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2014; GOBIKRUSHANTH et al., 2017).

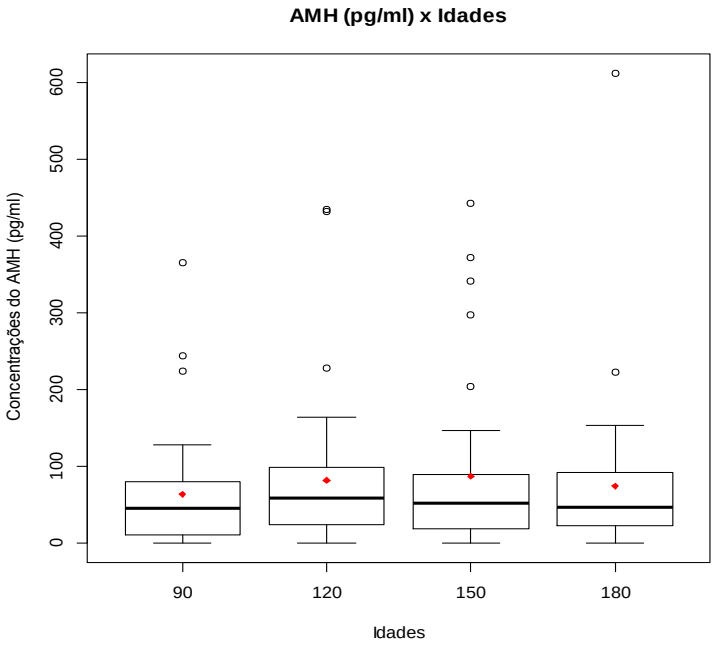


Figura 3- Concentrações do hormônio anti-mulleriano (AMH) nas idades pré-púberes (90 a 180 dias) de cordeiras da raça White Dorper;

Em geral, em 91% dos animais testados foi possível observar a presença da ovulação, com média de 3,27 ovulações durante as idades avaliadas (120 dias= 1,1, 150 dias = 1,2 e 180 dias = 1,0 ovulações por cordeira) e taxa de ovulação correspondente a 55%. As concentrações de AMH foram positivamente correlacionadas com a ocorrência da ovulação, em resposta a estimulação por eCG (p=0,37; P<0,05). Os animais que ovularam apresentaram concentrações séricas de AMH duas vezes maiores quando comparados aos animais que não ovularam. Esta diferença pode estar associada às alterações observadas no número de folículos crescentes na idade pré-puberal, onde uma população mista de folículos de diferentes estruturas e tamanhos (pequenos, médios e grandes) está presente no ovário. Autores como BARTLEWISKI et al. (2006) relataram que em ovinos as mudanças aconteceram principalmente na população de folículos antrais (2-3 mm de diâmetro), e que o pico de crescimento dos folículos ≥ 3 mm aconteceu com 120 a 180 dias após o nascimento.

Na Figura 4, apresentam se os dados de concentração sérica de AMH e o número de ovulações para as diferentes idades das fêmeas ovinas. A correlação entre as concentrações plasmáticas de AMH e o número de ovulações não foram significativas (p=0,21; P>0,05). Estes resultados são contrários aos observados na espécie bovina (MONNIAUX et al., 2012; RICO et al., 2012, SOUZA et al., 2015).

Esta diferença entre espécies pode ser justificada através das variações fisiológicas, de desenvolvimento e composição dos órgãos reprodutivos, bem como a proporção e o número de mediadores autócrinos e parácrinos presentes nos ovários. Protocolos de superovulação que utilizaram a aplicação exógena de FSH, por exemplo, apresentaram comportamentos opostos nessas espécies; onde em fêmeas bovinas, a administração de FSH desencadeou o aumento das concentrações plasmáticas de AMH durante o estro, enquanto em pequenos ruminantes essas concentrações foram diminuídas (RICO et al., 2009, MONNIAUX et al., 2011).

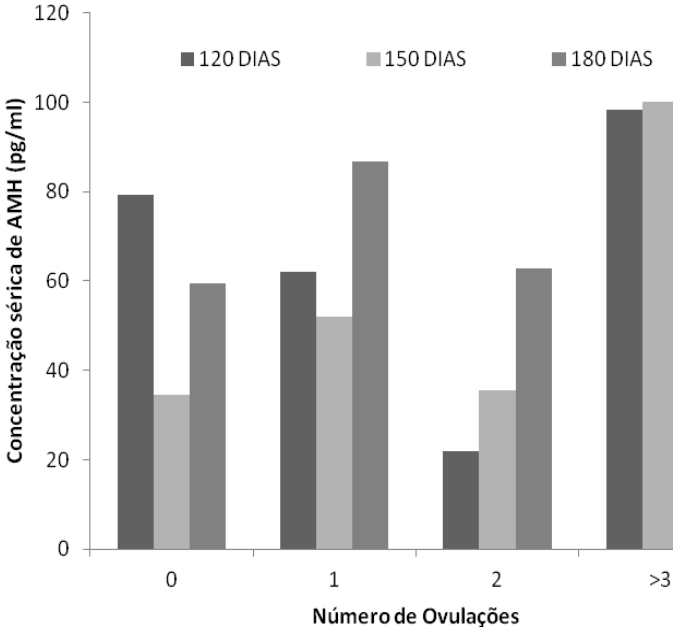


Figura 4-Concentração plasmática de AMH (pg/ml) após estimulação hormonal por eCG (600 UI) de acordo com o número de ovulações observadas nas idades de 120, 150 e 180 dias para cordeiras White Dorper;

Estudos anteriores demonstraram correlação positiva entre a contagem folicular antral (CFA) e as concentrações plasmáticas de AMH, como forma de predizer a reserva folicular ovariana (CAMPBELL et al., 2012; TORRES-ROVIRA et al., 2014). No presente trabalho, as concentrações plasmáticas de AMH não foram correlacionadas com a CFA (p=0,11; P>0,05) podendo ser justificada, devido a época de nascimento das cordeiras White Dorper (contra estação reprodutiva), período no qual a atividade ovariana é retardada em 4 semanas quando comparada com as cordeiras nascidas na primavera (Foster,1981).

Há também limitação da técnica da laparoscopia, visto que foi possível determinar apenas os folículos visíveis em momentos específicos do período pré-

puberal. Em pesquisas que encontraram esta correlação alta e positiva, foram utilizadas técnicas de histologia a partir de ovários coletados no momento do abate ou a ultrassonografia ovariana. Neste caso, os métodos que necessitem do abate dos animais, inviabilizam o objetivo da pesquisa, uma vez que, o critério utilizado é o de selecionar animais por meios não invasivos, que permitam a identificação daqueles que promovam maior ganho genético ao rebanho através da capacidade reprodutiva. Por outro lado, a ultrassonografia transretal permite a varredura do sistema genital através do uso de sondas de alta resolução, identificando da população de folículos presente nos ovários antes da administração exógena de hormônios que potencializam o crescimento folicular. Entretanto, para pequenos ruminantes em geral, esta é uma técnica difícil de ser aplicada, principalmente por limitações de tamanho dos órgãos reprodutivos que dificultam a dinâmica e determinação das estruturas, o que favorece os erros de contagem causados pela estimativa de folículos pequenos (GONZALEZ-BULNES et al., 2010).

Ao longo do período experimental foram observados aumentos gradativos da CFA em resposta a aplicação de eCG (Tabela 1), que podem estar associados ao desenvolvimento corporal seguido da maturação ovariana e do eixo hipotalâmico-hipofisário. Embora a base biológica para esse fenômeno seja desconhecida, a explicação intuitiva é que a dupla atividade do eCG esteja relacionada com determinante estrutural de receptores LH e de FSH, que promoveram o crescimento de 43% dos folículos na idade de 120 para a de 150 dias das fêmeas White Dorper.

Tabela 1 – Efeito da idade sobre as variáveis reprodutivas de cordeiras da raça White Dorper;

	Idade				
Variáveis	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Valor de P
Contagem folicular antral (un)	X	4 ± 0^{a}	7 ± 0^{b}	9 ± 2^{b}	P<0,05
Hormônio anti-mulleriano (pg/ml)	60,1±27	60,5±33	52,34±18	60,5±24	P>0,05
Ovulações (%)	X	81% (30/37)	84% (31/37)	60% (22/37	P>0,05

Diferentes sobrescritos indicam diferença estatística entre as idades : ;P<0,05 ANOVA;

A literatura relata que idade e o início do estro, da puberdade, fertilidade e a taxa reprodutiva são todos influenciados pelo potencial genético de crescimento pré-desmame e pós-desmame. A Figura 6 representa a relação do peso corporal em função da idade fêmeas ovinas no período pré-desmame e revelam que ao nascimento (4±0,8 kg) até os 60 dias de idade (19±3 kg) houve elevado crescimento corporal, com ganho de peso de 8 kg em intervalo de 30 dias. As cordeiras apresentaram ganho de peso médio diário (GPMD) de 258 g/dia no pré-desmame e 176 g/dia no pós-desmame, estes valores são adequados para esta fase do crescimento corporal e concordam com os resultados apresentados por ORTIZ et al. (2005).

Contudo sugere-se que peso corporal e ganho de peso médio diário (GPMD), não interferiram na expressão das características reprodutivas observadas pelas cordeiras da raça White Dorper, pois as concentrações plasmáticas de AMH não foram correlacionadas com o peso corporal e ganho de peso médio diário (GPMD) (P>0,05).De fato, os trabalhos que abordam a determinação sérica do AMH, não descrevem ou comentam esse tipo de correlação, subentendendo-se que há necessidade de investigar melhor essa perspectiva, pois, parte-se do princípio de que há ligação fisiológica entre a taxa de crescimento, início da puberdade e taxa de prenhez (NIETO et al., 2013).

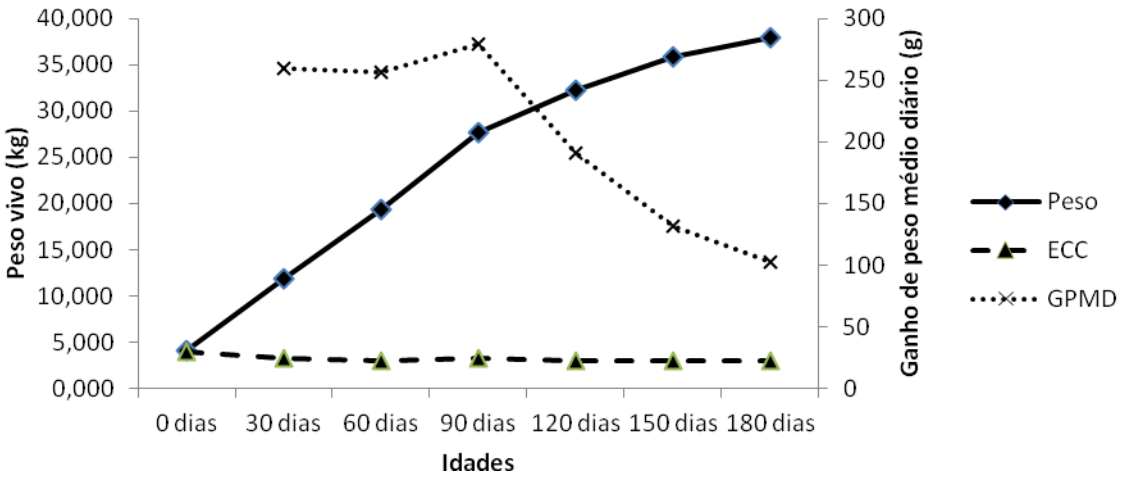


Figura 5 - Peso corporal (kg) de cordeiras da raça White Dorper do nascimento até os 180 dias de idade;

Os resultados demonstram que o comportamento expresso das concentrações de AMH na idade pré-púbere foram capazes de predizer a taxa de

prenhez na primeira estação de monta. Cordeiras que demonstraram baixas concentrações de AMH na idade pré-púbere (*n*=8/19) tiveram maior dificuldade de emprenhar quando comparada ás que demonstraram altas concentrações de AMH (Figura 5). No grupo de animais que demonstrou alta concentração de AMH, a taxa de prenhez foi de 52,6% na primeira monta; para os animais que foram submetidos a segunda monta, a taxa de prenhez correspondeu a 36%. Neste grupo (*n*=19), dois animais que não se tornaram gestantes apresentaram concentrações de AMH de 0,00 pg/ml e 58,00 pg/ml.

Em humanos também tem sido relatada forte associação das concentrações de AMH com a fertilidade. Estudos conduzidos em mulheres demonstraram que baixos índices de concentração plasmática de AMH estão associados à infertilidade ou disfunção ovulatória (FONG et al., 2015). Do mesmo modo, vacas com baixas concentrações séricas de AMH demonstraram que o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos foram comprometidas (IRELAND et al., 2011), uma vez que, aumentaram a secreção de gonadotrofinas mas, apresentaram concentrações reduzidas de progesterona (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

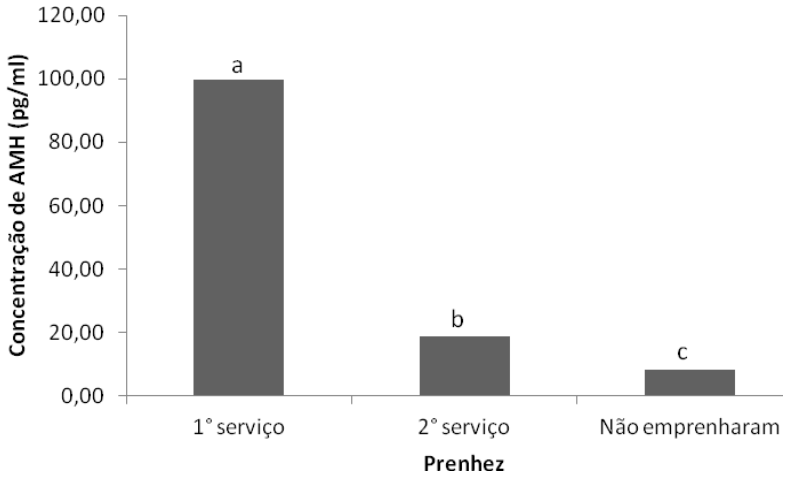


Figura 6-Relação entre AMH na idade pré-puberal e a fertilidade de cordeiras White Dorper; (Letras minúsculas diferentes diferem entre si para os períodos de serviço, P<0,05, ANOVA);

As concentrações plasmáticas de AMH nas idades avaliadas foram correlacionadas com taxa de prenhez na primeira cobertura (Tabela 2). Aos 90, 120 e 150 dias de idade não foram encontradas correlações significativas (P>0,05), entretanto aos 180 dias foi observado que os animais que apresentaram maiores

concentrações plasmáticas de AMH também foram aqueles que se tornaram gestantes na primeira monta (*p*=0,66; P<0,05).

Tabela 2- Valores de correlação entre a concentração plasmática de AMH e a taxa de prenhez de cordeiras da raça White Dorper em idades pré-puberais;

	Concentrações plasmáticas de AMH (pg/ml)			
Variável	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Taxa de prenhez	0,45	0,00	0,00	0,66
Valor de P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05

ns= não significativos a ANOVA; *diferenças significativas a ANOVA 5%.

Tal cenário suporta que a concentração de AMH no período pré-puberal pode predizer a taxa de prenhez de cordeiras no primeiro serviço. As cordeiras White Dorper deste estudo apresentaram resultados semelhantes aos reportados por Lahoz et al. (2012), que relataram que a fertilidade no primeiro e segundo serviço de fêmeas da raça Aragonesa foram correlacionadas com a concentração de AMH na fase pré-puberal. Também observaram que a concentração plasmática de AMH foi maior nas ovelhas que emprenharam no primeiro acasalamento do que nas que não conseguiram conceber no primeiro serviço, mas que ficaram gestantes no segundo acasalamento (P<0,05) ou em ovelhas não prenhes após dois períodos de serviço (P<0,01).

Sugere-se que são necessárias mais pesquisas para alcançar valores de referência e padronização das concentrações de AMH para os critérios de seleção, e também determinar as possíveis mudanças na concentração de AMH, verificando outros aspectos que afetam que possam influenciar no processo de liberação de AMH na idade pré-puberal e bem como, elucidar os mecanismos pelos quais influenciaram a fertilidade de cordeiras.

7 CONCLUSÃO

As concentrações plasmáticas de AMH estão pouco associadas à contagem folicular antral em animais da espécie ovina, entretanto, podem auxiliar na tomada de decisões sobre habilidade de resposta a protocolos hormonais, ovulação e taxa de prenhez na vida pré-puberal. Dessa forma, apresenta-se como uma alternativa para a identificação precoce de capacidade reprodutiva de fêmeas ovinas. .

Financiamento

Este projeto foi financiado pelo CNPq 402977/2012-2; Pesquisador visitante especial/CSF.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. **Small Ruminant Research**. v.63, p.189–198, 2006.

CAMPBELL, B. K.; CLINTON, M.; WEBB, R. The role of anti-müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory Species (Sheep). **Endocrinology**. v.153, p. 4533-4543, 2012.

FONG, S.L.; SCHIPPER, I.; VALKENBURG O.; JONG, F.H,VISSER, J.A.; LAVEN, J.S. The role of anti-Mullerian hormone in the classification of anovulatory infertility. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**. v.186, p.75-9, 2015.

FOSTER, D.L. Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). **Biology Reproduction**. v. 25, p.85-92, 1981.

GOBIKRUSHANTH, M.; DUTRA, P.A.; BRUINJ, T.C.; COLAZO, M.G.; BUTLER, S.T.; AMBROSE, D.J. Repeatability of antral follicle counts and anti-mullerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. **Theriogenology**. v. 92, p.90-94, 2017.

HUISMAN, A.E.; BROWN, D.J. Genetic parameters for bodyweight, wool, and disease resistance and reproduction traits in Merino sheep. 3. Genetic relationships between ultrasound scan traits and other traits. **Animal Production Science**. v.49, p.283–288, 2009.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of AMH as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction Fertility Development**. v.23, p.1-14, 2011.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN,R. J.; FERRIS, T.; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal Dairy Science**. v.98, p.1–10, 2015.

KENYON, P.R.; MORRIS, S.T.; WEST, D.M. The proportion of rams and the condition of ewe lambs at joining influences their breeding performance; **Animal Production Science**. v. 50, p.454–459, 2010.

LAHOZ, B.; ALABART, J.L.; MONNIAUX, D.;MERMILLOD, P.; FOLCH, J. Anti-Mullerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. **Biomedcentral Veterinary Research**. v.8, p.1746-6148, 2012.

MONNIAUX, D.; BARIL G.; LAINE, A.L.; JARRIER, P.; POULIN N.; COGNIE J.; FABRE S. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**. v.142, p. 845–854, 2011.

MONNIAUX, D.; DROUILHET L.; RICO, C.; ESTIENNE, A.; JARRIER, P.; TOUZE, J.; SAPA, J.; PHOCAS, F.; DUPONT, J.; DALBIES-TRAN, R.F. S. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. **Reproduction Fertility and Development**. v.25, p.1–16, 2013.

NIETO, C.A.R., FERGUSON, M.B., MACLEAY, C.A., BRIEGEL, J.R., WOOD, D.A., MARTIN, G.B., THOMPSON, A.N. Ewe lambs with higher breeding values for growth achieve higher reproductive performance when mated at age 8 months. Theriogenology, v.80, p.427–435, 2013.

RICO, C.; DROUILHET L.; SALVETTI, P.; DALBIES-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZE, J.L., PILLET E., PONSART, C., FABRE S., MONNIAUX, D. Determination of anti-Mullerian 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**. v. 24, p. 932-44, 2012.

RICO, C.; FABRE, S.; MEDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLE´MENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZE, J.L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; REMY, B.; BECKERS, J.F.; MONNIAUX, D. Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology Reproduction**. v. 80, p**.** 50–59, 2009.

RICO, C.; MEDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONTOUX, M.; DI CLEMENTE, F.; MONNIAUX, D. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: A multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology Reproduction** v. 84, p. 560–571, 2011.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN,R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal Agricultural Science**. v.72, p.451- 454,1969.

SCARAMUZZI, R.; CAMPBELL, B.; DOWNING, J.; KENDALL, N.; KHALID, M.; MUNOZ-GUTIERREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**. v. 46, p. 339–354, 2006.

SOUZA , A. H.; CARVALHO , P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA , L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal Dairy Science.** v.98, p.1–10, 2014.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P..; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Sciencie**. v.98, p.169–178, 2015.

TORRES-ROVIRA, L.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MANCA, M. E.; LEONI, G.G.; SANNA, M.; PIRINO, S.; GALLUS, M.; NAITANA, S.; BERLINGUER,F. Predictive value of antral follicle count and anti-Mullerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. **Reproduction Fertility and Development**. v.26, p.1094–1106, 2014.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. **Proceedings...**, p.51-63, 1997.

ANEXOS

Tabela 3 - Valores de correlação entre a concentração plasmática de AMH o peso (kg), ovulações, número de ovulações e contagem folicular antral (un) de fêmeas ovinas da raça White Dorper em idades pré-puberais;

	Concentrações plasmáticas de AMH (pg/ml)			
Variável	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Peso (kg)	-0,21*	- 0,09^{ns}	-0,07^{ns}	0,15^{ns}
Ovulações (un)	X	-0,25^{ns}	0,1^{ns}	0,13^{ns}
Número de ovulações (un)	X	0,11	0,15	0,13
Contagem folicular antral (un)	X	0,14^{ns}	0,14^{ns}	0,12^{ns}

ns= não significativos a ANOVA; *diferenças significativas a ANOVA 5%.

Tabela 4 - Valores de correlação entre a contagem folicular antral, o peso (kg), ovulações, número de ovulações de fêmeas ovinas da raça White Dorper em idades pré-puberais;

	Contagem folicular antral (un)		
Variável	120 dias	150 dias	180 dias
Peso (kg)	0,39*	0,16^{ns}	-0,17^{ns}
Ovulações (un)	0,35*	0,30^{ns}	0,15^{ns}
Número de ovulações (un)	0,15^{ns}	0,15^{ns}	-0,13^{ns}

ns= não significativos a ANOVA; * diferenças significativas a ANOVA 5%;

Tabela 5 – Valores de correlação entre as idades pré-puberais de avaliação e o peso (kg), GPMD (g), contagem folicular antral (un), ovulações, número de ovulações e concentrações plasmáticas do hormônio anti-mulleriano (pg/ml) em femeas ovinas da raça White Dorper;

Variável	Peso	GPMD	CFA	Ovulações	N° de ovulações	AMH (pg/ml)
Idade	0,36*	-0,36*	0,42*	-0,29*	$0,09^{ns}$	$0,00^{ns}$
Peso (kg)	-	-	0,37*	$-0,12^{ns}$	$-0,02^{ns}$	$-0,05^{ns}$
Ganho de peso médio diário (g)	-	-	$0,09^{ns}$	$0,05^{ns}$	$-0,05^{ns}$	$0,04^{ns}$
Ovulações (un)	$0,05^{ns}$	$0,12^{ns}$	$-0,02^{ns}$	-	-	0,37*
Número de ovulações (un)	$0,13^{ns}$	$0,00^{ns}$	$-0,04^{ns}$	-	-	$0,21^{ns}$
Contagem folicular antral (un)	0,27*	$0,09^{ns}$	-	-0,23*	$0,02^{ns}$	$0,11^{ns}$
Concentração de AMH (pg/ml)	$0,0^{ns}$	$0,0^{ns}$	$0,11^{ns}$	0,37*	$0,21^{ns}$	-

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 072/2015, referente ao projeto **"Identificação precoce da fertilidade de fêmeas ovinas em rebanhos comerciais de produção de carne"**, sob a responsabilidade de **Alda Lúcia Gomes Monteiro** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau B de invasividade, em reunião de 01/10/2015

Vigência do projeto	23/10/2015 a 25/11/2015
Espécie/Linhagem	Ovinos
Número de animais	30
Peso/Idade	Variado
Sexo	Fêmeas
Origem	LAPOC-UFPR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 072/2015, regarding the project **"Previous identification of fertility in female sheep in commercial herds of meat production"**, under **Alda Lúcia Gomes Monteiro** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree B of invasiveness, in session of 10/01/2015.

Duration of the project	10.23.2015 to 11.25.2015
Specie/Line	Sheep
Number of animals	30
Wheight/Age	Vary
Sex	Females
Origin	LAPOC-UFPR

Curitiba, 01 de Outubro de 2015.

Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR

Este projeto foi financiado pelo CNPq 402977/2012-2; Pesquisador visitante especial/CSF.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABECIA J.A., FORCADA, F., GONZÁLEZ-BULNES, A., Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p. 173– 179, 2012.

ALI, A., S. FAHMY. Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (Bubalus bubalis) during Ovsynch program. **Theriogenology**, v. 68, p. 23–28, 2007.

BAKER, J., HARDY, M.P., ZHOU, J., BONDY, C., LUPU, F., BELLVÉ, A.R., EFSTRATIADIS, A., Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. **Molecular Endocrinology**, v.10, p. 903–918, 1996.

BARRETT, D.M.W., BARTLEWSKI, P.M., BATISTA-ARTEAGA, SYMINGTON, M., A., RAWLINGS, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology,** v. 61, p. 311–327, 2004.

BARTLEWSKI, P.M., BABY, T.E., GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, p. 259-268, 2011.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. Small **Ruminant Research**, v.43, p. 37–44, 2002.

BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. **Small Ruminant Research,** v.63, p.189–198, 2006.

BARTLEWSKI, P.M.,SEATON,P, OLIVEIRA, M.E.F., KRIDLI, R.T, MURAWSKI, M., SCHWARZ, TOMASZ, Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v.86, p. 1–14, 2016.

BATISTA, E.O.S., GUERREIRO, B. M, FREITAS, B.G. SILVA, J.C.B., VIEIRA, L.M., FERREIRA, R.M., REZENDE 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**, v. 54, p. 1–9, 2016.

CAMPBELL, B. K.; CLINTON, M.; WEBB, R. The role of anti-müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory Species (Sheep). **Endocrinology**. v.153, p. 4533-4543, 2012.

CAMPBELL, B., SCARAMUZZI, R., WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p. 335–350, 1995.

CAMPBELL, B.K., BAIRD, D.T. Inhibin-A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulose cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. **Journal Endocrinology**, v.169, p. 333–345, 2001.

CAMPBELL, R.E, HERBISON A.E. Definition of brainstem afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in the mouse using conditional viral tract tracing. **Endocrinology**, v.148, p. 5884–5890, 2007.

CARCANGIU, V., VACCA, G.M., PARMEGGIANI, A., MURA, M.C., BINI, P.P. Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does. **Small Ruminant Research**. v. 59, p. 7–13, 2005.

CARDOSO D.; NOGUEIRA, G.P.Mecanismo neuriendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia**. v.10, p.59-67, 2007.

CATE, R.L., MATTALIANO, R.J., HESSION, C., TIZARD, R., FARBER, N.M., CHEUNG, A., Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells, **Cell**, v. 45, p. 685–698, 1986.

CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., BRILLARD, J.P., FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. **Animal**, v.3, p.419–432, 2007.

CLOETE, S.W.P., SNYMAN, M. A., HERSELMAN, M. J. Productive performance of Dorper sheep. **Small Ruminant Research,** v.36, p.119-135, 2000.

DODD, C.L., PITCHFORDA, W. S., EDWARDS, J. E. H., HAZEL, S.J., Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A review. **Applied Animal Behaviour Science**, v.140, p. 1– 15, 2012.

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

DURLINGER, A.L. L., GRUIJTERS, M.J. G., KRAMER, P., KARELS, B., RAJENDRA KUMAR, T. MATZUK, M. M., ROSE, U.M., JONG , F.H., UILENBROEK, J.T. J.GROOTEGOED, J. A., THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. **Endocrinology**, v.142, p. 4891-4899, 2001.

EBLING, F. J. P. The neuroendocrine timing of puberty. Reproduction. v.129, p. 675–683, 2005.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reproduction Domestic Animal,** v. 38, p.240-246, 2003.

EVANS, A.C.O.; DUFFY, P.; HYNES, N., BOLAND, M.P.; Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep, **Theriogenology**. v.53, p. 699–715, 2000.

FONG, S.L.; SCHIPPER, I.; VALKENBURG O.; JONG, F.H,VISSER, J.A.; LAVEN, J.S. The role of anti-Mullerian hormone in the classification of anovulatory infertility. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology.** v.186, p.75-9, 2015.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, GO, Anais: Palestras, 2005.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**. v. 82, p.109–126, 2004.

FOSTER, D.L. Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). Biology Reproduction. v. 25, p.85-92, 1981.

GINTHER, M.A. BEG, F.X. DONADEU, D.R. BERGFELT, Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. v. 78, p.239–257, 2003.

GOBIKRUSHANTH, M.; DUTRA, P.A.; BRUINJ, T.C.; COLAZO, M.G.; BUTLER, S.T.; AMBROSE, D.J. Repeatability of antral follicle counts and anti-mullerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows**. Theriogenology**. v. 92, p.90-94, 2017.

GOFF, K. J., KNIGHT, J. W., PELZER, K. D. , AKERS, R. M., NOTTER, D. R. Circannual changes in progesterone secretion in intact ewes, luteinizing hormone secretion in ovariectomized estradiol-implanted ewes, and prolactin secretion in three sheep breeds anticipated to differ in seasonality of reproduction. **Animal reproduction Science**. v. 138, p. 194–202, 2013.

GONG, J.G., CAMPBELL, B.K. BRAMLEY, T.A. Treatment with recombinant bovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles in ewes. **Animal Reproduction Science**. v. 41, p. 13-26, 1996.

GOODMAN, R.L., INSKEEP K., **Control of the Ovarian Cycle of the Sheep**- cap 27. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), p. 1259-1305, 2015.

GRUIJTERS, M.J., VISSER, J.A., DURLINGER, A.L., THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 211, p.85–90, 2003.

HAZLERIGG, D.G., WAGNER, G.C. Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. **Trends Endocrinology Metabolism**. v.17, p. 83–91, 2006.

HUDSON, P.L.; DOUGAS, I., DONAHOE; P.K., CATE, R.L.; EPSTEIN, J.; PEPINSKY, R.B.; MACLAUGHLIN, D.T. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.70, p.16–22, 1990.

HUISMAN, A.E.; BROWN, D.J. Genetic parameters for bodyweight, wool, and disease resistance and reproduction traits in Merino sheep. 3. Genetic relationships between ultrasound scan traits and other traits. **Animal Production Science**. v.49, p.283–288, 2009.

HUTT, K.; MCLAUGHLIN E.; HOLLAND M. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Molecular Human Reproduction**. v.12, p. 61– 69, 2006.

IRELAND, J.J.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.. IRELAND, J.L.H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of AMH as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction Fertility Development.** v.23, p.1-14, 2011.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN,R. J.; FERRIS, T.; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal Dairy Science**. v.98, p.1–10, 2015.

KENYON, P. R. et al. Review of sheep body condition in relation to production characteristics.**New Zealand Journal of Agricultural Research**. v. 57, p. 38– 64, 2014.

KENYON, P.R.; MORRIS, S.T.; WEST, D.M. The proportion of rams and the condition of ewe lambs at joining influences their breeding performance; **Animal Production Science**. v. 50, p.454–459, 2010.

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

LA MARCA, A., BROEKMANS, F.J., VOLPE, A., FAUSER, B.C., MACKLON, N.S. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? **Human Reproduction**. v. 24, p. 2264–2275, 2009.

LA MARCA, A., SIGHINOLFI, G., RADI, D., ARGENTO, C., BARALDI, E., CARDUCCI ARTENISIO, A., STABILE, G. E VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Human Reproduction**. v. 16, p. 113–130, 2010.

LAHOZ, B., ALABART, J.L., MONNIAUX, D., MERMILLOD, P., FOLCH, J. Anti-Mullerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. **Biomedcentral Veterinary Research**. v.8, p.1746-6148, 2012.

LINCOLN G.A, CLARKE I.J, HUT R.A, HAZLERIGG D.G. Characterizing a mammalian circannual pacemaker. **Science**. v.314, p.1941–4, 2006.

LURIDIANA, S. , MURA, M.C. ,DAGA, C. ,DIAZ, M.L. ,BINI, P.P. ,COSSO, G. ,CARCANGIU, V. The relationship between melatonin receptor 1A gene (MTNR1A) polymorphism and reproductive performance in Sarda breed sheep. **Livestock Science**. v.171, p. 78–83, 2015.

MADGWICK, S.; EVANS, A.C.O.; BEARD, A.P. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. **Theriogenology**. v. 63, p. 2323–2333, 2005.

MAHDI, D., KHALLILI, K. Relationship between follicle growth and circulating gonadotropin levels during postnatal development of sheep. **Animal Reprodution Science**. v.106, p.100-112, 2008.

MCCAFFERY, F.H., LEASK, R., RILEY, S.C., TELFER, E.E., Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction.** v. 63, p. 267–273, 2000.

MCGEE, E.A., CHUN, S.-Y., LAI, S., HE, Y.-E., HSUEH, A.J.W., Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. Fertility **and Sterility**. v.71, p. 732–738, 1999.

MCNATTY, K.P., FIDLER, A.E , JUENGEL, J.L., QUIRKE, L.D , SMITH, P.R , HEATH, D.A , LUNDY, T., O'CONNELL, A, TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.11–20, 2000.

MIGAUD M. ; BUTRUILLE L. ; DUITTOZ, A.; PILLON, D. ; BATAILLER, M. Adult neurogenesis and reproductive functions in mammals. **Theriogenology** . v.86, p. 313–323, 2016.

MONNIAUX, D.; BARBEY, S.; RICO, C.; FABRE, S.; GALLARD, Y.; LARROQUE, H. Anti-Mullerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? **Reprodution Fertility Development**. v.22, p.1083–1091, 2010.

MONNIAUX, D.; BARIL G.; LAINE, A.L.; JARRIER, P.; POULIN N.; COGNIE J.; FABRE S. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. **Reproduction**. v.142, p. 845–854, 2011.

MONNIAUX, D.; DROUILHET L.; RICO, C.; ESTIENNE, A.; JARRIER, P.; TOUZE, J.; SAPA, J.; PHOCAS, F.; DUPONT, J.; DALBIES-TRAN, R.F. S. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals**. Reproduction Fertility and Development**. v.25, p.1–16, 2013.

MORAES, J. C. F., SOUZA, C. J. H., GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, São Paulo: Varela, p.25-35, 2002.

MURA, M.C., LURIDIANA, S., BODANO, S., DAGA, C., COSSO, G., DIAZ, M.L., BINI, P.P.V. Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms onseasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. **Animal Reproduction Science**. v.149, p.173–177, 2014.

MURAYAMA C., MIYAZAKI H., MIYAMOTO, A., SHIMIZU, T. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 350, p. 1–9, 2012.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**. v.9, p.223-230, 2012.

NIETO, C.A.R., FERGUSON, M.B., MACLEAY, C.A., BRIEGEL, J.R., WOOD, D.A., MARTIN, G.B., THOMPSON, A.N. Ewe lambs with higher breeding values for growth achieve higher reproductive performance when mated at age 8 months. **Theriogenology,** v.80, p.427–435, 2013.

NÚNEZ-OLIVERA R., CASTRO, T., GARCÍA-PINTOSA, C., BÓB, G., PIAGGIOD, J., MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol'based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**. v.146, p.111-6, 2014.

PALMA, G. A., ARGAÑARAZ, M. E., BARRERA, A.D, RODLER, D., MUTTO, A.A., SINOWATZ, F. Biology and biotechnology of follicle development. **Scientific World Journal**. p. 938-138, 2012.

PASCAL, C., IVANCIA, M., GILCA,I., NACU G., MACIUC, V., Researches regarding meat quality in young sheep from the Romanian local breed, International Symposium, Anais, 2008.

PAWSON, A. J., MCNEILLY, A. S., The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**. v.88, p. 75–94, 2005.

PIGNY, P.; MERLEN, E.; ROBERT, Y.; CORTET-RUDELLI, C.; DECANTER, C., JONARD, S.; DEWAILLY, D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, p. 5957-5962, 2003.

QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.L.; PORTER, D.A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. **Journal of Animal Science,** v.82, p. 40-52, 2004.

RAJPERT-DE MEYTS, E., JORGENSEN, N., GRAE, 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, **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, p. 3836-3844, 1999.

RANTALA, M. H.; TAPONEN, J., L.H secretion around induced ovulation during early and late diestrus and its effect on the appearance of short estrous cycles in cyclic dairy heifers.**Theriogenology** . v.83, p.1–7, 2014.

RAWLINGS, N.C.; BARTLEWSKI, P.M - **Clinical reproductive physiology of ewes**. Youngquest, RS, Threlfall, (2nd Eds.), 2007.

RICO, C.; DROUILHET L.; SALVETTI, P.; DALBIES-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZE, J.L., PILLET E., PONSART, C., FABRE S., MONNIAUX, D. Determination of anti-Mullerian 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**. v. 24, p. 932-44, 2012.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M;, TOUZÉ, J.L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; BENOÎT, R.; 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 Reprodution.** v.80, p.50–59, 2009.

RICO, C.; MEDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONTOUX, M.; DI CLEMENTE, F.; MONNIAUX, D. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: A multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology Reproduction** v. 84, p. 560–571, 2011.

ROMERO,R.A.A.; FRANCO, J.A.Q.; SANCHEZ,D.H.; TORRES,T.S.; AMEZCUA, E.V.; UGALDE,J.R.; RODRIGUEZ,J.B.; QUINTERO, R.B.; CASTILLO, J.G.C. Ovarian activity in F1 prepubertal ewe lambs under tropical conditions. **Livestock Science**. v. 143, p.24–28, 2012.

ROSA, H.J.D, BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**. v. 48, p.155–171, 2003.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reprodutiva em cabras y ovejas. In: Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. São Paulo. Anais, São Paulo: FMVZ-UNESP-USP, p.255-282. 2000.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN,R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal Agricultural Science.** v.72, p.451- 454,1969.

SÁ FILHO, M.F.; TORRES- JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADOC, L. L.;, GIMENES, U.; FERREIRA, R.M.; AYRESA, H.; CASTRO, PAULA, L.A.; SALESA, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Animal Reproduction Science**. v. 118, p.182–187, 2010.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogenese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SAWALHA, M.N.; KRIDLI, R.T.; JAWASREH, K.I.; MEZA-HERRERA, C.A. The use of melatonin and progestagen–eCG to initiate reproductive activity in prepuberal Awassi ewe lambs. **Tropical Animal Health Production**. v.43, p.1345–1350, 2011.

SCARAMUZZI, R.; CAMPBELL, B.; DOWNING, J.; KENDALL, N.; KHALID, M., MUNOZ-GUTIERREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**. v. 46, p. 339–354, 2006.

SCHAMS, D.; BERISHA B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction Domestic Animal**. v.39, p.241–251, 2004.

SCHILLO, K. K.; DIERSCHKE, D. J.;HAUSER, E. R. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: Increased threshold to negative feedback action of estradiol. **Journal of Animal Science**. v.54, p. 325-336, 1982.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.98, p.169–178, 2015.

TOELLE, V.D.; ROBISON, O.W. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. **Journal Animal Sciencie**. v.60, p.89-100, 1985.

TORRES-ROVIRA, L.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MANCA, M. E.; LEONI, G.G.; SANNA, M.; PIRINO, S.; GALLUS, M.; NAITANA, S.; BERLINGUER,F. Predictive value of antral follicle count and anti-Mullerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. **Reproduction Fertility and Development.** v.26, p.1094–1106, 2014.

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

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. Proceedings..., p.51-63, 1997.

VERNUNFT, A.;SCHNEIDER, F.; KANITZ, W. Anti-Muellerian Hormone (AMH) can help to predict follicular growth in mares. **Reprodution Domestic Animal**. v.46, p.44, 2011.

VISSER, J. A.; THEMMEN, A.P.N. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. **Molecular and Cellular Endocrinology**.v. 382 , p. 460–465, 2012.

VISSER, J.A.; DE JONG, F.H.; LAVEN, J.S.; THEMMEN, A.P. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction.** v.131, p.1-9, 2006.

ZAVALA, R. E.; ORTIZ, J. R.; UGALDE, O.J. P.R; MORALES, P. M.; VÁSQUEZ, A. S.; GARCÍA, J.R.S. Pubertad en hembras de cinco razas ovinas de pelo e condiciones de trópico seco. **Zootecnia Tropical.**v. 26, p. 465-473, 2008.