

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

HALLEY SCHUCH PASSOS

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS
SANTA INÊS PORTADORAS DO POLIMORFISMO $FecG^E$
DO GENE GDF-9**

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



HALLEY SCHUCH PASSOS

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS
SANTA INÊS PORTADORAS DO POLIMORFISMO $FecG^E$
DO GENE GDF-9**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador:
Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo

Co-orientador:
Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Passos, Halley Schuch

P 289d Dinâmica folicular ovariana em ovelhas Santa Inês portadoras do polimorfismo FecGE do gene GDF-9 / Halley Schuch Passos ; orientador : Hymerson Costa Azevedo. – São Cristóvão, 2014.

54 f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

O

1. Zootecnia. 2. Ovinos. 3. Período interovulatório. 4. Ovinos - Raça Santa Inês. 5. Ultrassonografia. I. Azevedo, Hymerson Costa, orient. II. Título

CDU 636.38.082

HALLEY SCHUCH PASSOS

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS PORTADORAS DO
POLIMORFISMO FecG^E DO GENE GDF-9**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

APROVADO em 18 de julho de 2014

Prof. Dr. José Correia Neto (IFS)

Profa. Dra. Isabel Bezerra Lima Verde (Unit-ITP)

Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos (UFS)

Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo (Orientador – Embrapa)

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2014

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	2
1.1. Característica e perfil endócrino do ciclo estral na ovelha.....	2
1.2. Foliculogênese	4
1.2.1. Estrutura ovariana	4
1.2.1. Fases da foliculogênese.....	4
1.2.3. Fisiologia da foliculogênese.....	7
1.3. Dinâmica folicular	11
2.4. Fertilidade de fêmeas ovinas portadoras dos genes da prolificidade.....	13
2. REFERÊNCIAS.....	16
3. ARTIGO	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Animais e grupos experimentais	28
2.2. Procedimentos	29
2.2.1. Manipulação prévia do ciclo estral e acompanhamento da dinâmica folicular.....	29
2.3. Análise estatística	30
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4. CONCLUSÃO	36
5. REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros (média \pm E.P.M.) resultantes do monitoramento do desenvolvimento folicular ovariano em um período interovulatório de 21 ovelhas Santa Inês nulíparas do tipo selvagem (WW, n=7); heterozigota (EW, n=7) e homozigota (EE, n=7) para o polimorfismo FecG ^E do gene GDF-9.	33
Tabela 2. Parâmetros (média \pm E.P.M.) resultantes do comportamento estral em um período interovulatório de 21 ovelhas Santa Inês nulíparas do tipo selvagem (WW, n=7); heterozigota (EW, n=7) e homozigota (EE, n=7) para o polimorfismo FecG ^E do gene GDF-9.	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo da ação endócrina no ciclo estral de ovinos.....	5
Figura 2. Esquema da estrutura e fisiologia ovarianas em ovinos.	7
Figura 3. Modelo da teoria da “janela”	8
Figura 4. Mecanismo da ação parácrina na foliculogênese.....	11

RELAÇÃO DAS ABREVIACÕES

AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina
BMP - Proteína morfogenética do osso
CL - Corpo lúteo
d – Dias
EE – genótipo homozigoto para o polimorfismo FecG^E
E.P.M. – Erro padrão da média
EW - genótipo heterozigoto para o polimorfismo FecG^E
FecG^E - Alelo do gene GDF-9
FSH - Hormônio folículo estimulante
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas
h - Hora
IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina I
im – intramuscular
Kg – Kilograma
KL – Fator de crescimento Kit Ligand
LH - Hormônio luteinizante
µg - Micrograma
M - Média
MHz - Mega Hertz
mm - Milímetro
n - Número
oFSH - Hormônio folículo estimulante ovino
PGF_{2α} - Prostaglandina F₂ alfa
P₄ - Progesterona
GDF-9 - Fator de crescimento de diferenciação 9
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo simples
WW – genótipo do tipo selvagem não portador do polimorfismo FecG^E

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente em todos os momentos!

A vocês meus pais e irmãos, que sempre tiveram comigo em tudo na minha vida, momentos ruins como na perda de um ente querido, como em momentos de extrema alegria como este. Minha vida sem vocês realmente não teria nenhum sentido, não tenho palavras para agradecer tudo isso. Amo vocês!

À todos os colegas e amigos do mestrado pelo companheirismo que estiveram comigo nos dias mais difíceis de estudo na biblioteca da EMBRAPA e na alegria no desenvolvimento e conclusão deste belo trabalho. Muito obrigado Vinícia, Sidney, Alan, Ana, Elisson.

Em especial gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos à amiga Carmen Gonzalez por ter me apoiado com ideias, discussões e soluções sempre muito cabíveis e que sem dúvida alguma foram o alicerce desta vitória. Muito obrigado por tudo.

Não poderia deixar de agradecer aos meus dois “braços” durante todo o longo período de trabalho árduo no campo. Muito obrigado Rebeca e Gabriel, esse trabalho tem muito de vocês.

Ao meu orientador Dr. Hymerson Costa Azevedo, pelo convite e oportunidade que me proporcionou de engrandecer meus conhecimentos.

Ao meu co-orientador Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos pelos treinamentos, conhecimentos e colaborações estatísticas concedidas. Muito obrigado

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de qualificação.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela disponibilidade do espaço físico e dos animais, bem como dos laboratórios.

Aos amigos do Campo Experimental Pedro Arle: Ítalo, Genival, Tonho, Nal, Binho, Paulinho (Caçarola), Nestorzinho, Tico, Orlando e Renilson, muito obrigado pelo apoio durante o experimento.

Ao meu irmão Daniel e sua equipe pelo auxílio com as análises estatísticas.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

PASSOS, Halley Schuch. **Dinâmica folicular ovariana em ovelhas Santa Inês portadoras do polimorfismo FecG^E do gene GDF-9**. Sergipe: UFS, 2014. 42p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

Este trabalho teve por objetivo o estudo da dinâmica folicular ovariana do período interovulatório em ovelhas nulíparas da raça Santa Inês portadoras do polimorfismo FecGE. Foram utilizadas 21 ovelhas previamente genotipadas para o polimorfismo FecGE por PCR-RFLP. Os animais foram divididos em três grupos (n=7/grupo) de acordo com o genótipo relacionado à mutação como segue: WW - selvagem não mutante; EW - heterozigoto e; EE - homozigoto. A dinâmica folicular foi acompanhada por ultrassom dentro de um período interovulatório. A captura e mensuração das imagens dos ovários foram feitas a cada 24 horas até a detecção do estro, sendo ajustadas para cada 12 horas até a ovulação. Foi verificado que 15 animais (71,42%) apresentaram a emergência de três ondas e seis (28,58%) apresentaram quatro ondas de crescimento folicular. Não houve influência do genótipo sobre o número de folículos selecionados, ≥ 2 e ≤ 4 mm, ($2,8 \pm 0,7$) e dominantes, >5 mm, ($0,9 \pm 0,1$), o período interovulatório ($17,5 \pm 0,2$) e, a duração do estro ($38,11 \pm 0,9$). O maior número de ovulações foi observado nas ovelhas homozigotas ($2,4 \pm 0,2$) em relação às do tipo selvagem ($1,7 \pm 0,2$) sendo as heterozigotas apresentando valor intermediário ($1,9 \pm 0,1$), porém não diferindo dos demais. Apesar dos grupos genéticos não diferirem quanto ao intervalo entre o início do estro e a ovulação ($25,34 \pm 1,8$ h), foi verificada alta variação individual entre as ovelhas dentro de cada genótipo. Ovelhas nulíparas Santa Inês portadoras do polimorfismo FecGE expressam diferenças no tempo de sobrevivência folicular e no diâmetro do folículo ovulatório em relação às não mutantes, sendo que o grupo genético homozigoto apresenta um maior número de ovulações.

Palavras-chave: ovinos, prolificidade, mutação, período interovulatório, ultrassonografia.

ABSTRACT

PASSOS, Halley Schuch. **Ovarian follicular dynamics in Santa Ines ewes carrying the polymorphism FecG^E of GDF-9 gene.** Sergipe: UFS, 2014. 42p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

This study aimed the study of ovarian follicular dynamics in a interovulatory period in nulliparous Santa Inês sheep carrying the polymorphism FecG^E. Were used 21 sheep that previously genotyped for FecG^E polymorphism by PCR-RFLP. The animals were divided into three groups (n = 7 / group) according to the genotype mutation: WW - non-mutant wild; EW – heterozygote and EE - homozygous. Follicular dynamics were monitored by ultrasound within a period interovulatory. The capture and measurement of the ovaries images were made every 24 hours until detection of estrus, being adjusted to every 12 hours until ovulation. It was found that 15 animals (71.42%) showed the emergence of three waves and six (28.58%) had four follicular waves. Don't were influence of genotype on the selection, follicles ≥ 2 and ≤ 4 mm, ($2,8 \pm 0,7$) and follicular dominance, follicles > 5 mm, ($0,9 \pm 0,1$), the interovulatory period ($17,5 \pm 0,2$) and the duration of estrus ($38,11 \pm 0,9$). The largest number of ovulations was observed in homozygous sheep (2.4 ± 0.2) compared to the wild type (1.7 ± 0.2), however, heterozygous presenting intermediate value (1.9 ± 0.1) but not differ from the others. Despite genetic groups did as not differ to the interval between the onset of estrus and ovulation ($25,34 \pm 1,8$), high individual variation was observed among sheep within each genotype. Santa Inês sheep that carriers the polymorphism FecG^E express some differences in ovarian follicular dynamics in relation to non-mutants, being represented mainly by the largest number of ovulations in homozygous genetic group.

Keywords: Sheep, prolificacy, mutation, interovulatory period, ultrasonography.

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos foram introduzidos no Brasil pelos portugueses no início da colonização. De acordo com o último censo, em 2011 o país possuía um efetivo de 17,7 milhões de cabeças de ovinos sendo que a sua maior concentração (57,2%) estava localizada na região Nordeste (IBGE, 2013). Esta concentração ressalta sua importância para o desenvolvimento econômico-social da região que é considerada como a grande exportadora de animais para outras localidades do país. Porém, apesar da alta adaptabilidade dos ovinos à diversidade edafoclimática do Brasil, os índices produtivos baixos são características ainda marcantes desse agronegócio no país.

O desenvolvimento da ovinocultura é necessário no contexto em que os mercados interno e externo tornam-se mais competitivos exigindo maior eficiência na produção. Desta maneira, é imprescindível a busca por novas tecnologias que venham aumentar a produtividade dos rebanhos, de forma que as melhorias nos aspectos reprodutivos ocupam um lugar de destaque. Nesse sentido, em programas de seleção e melhoramento animal, o estudo da prolificidade passa a ser um fator de alto impacto econômico (HOLANDA et al., 2006; COSTA et al., 2011). Em consonância, a obtenção de altas produções com eficiência econômica exige, além de investimentos em animais geneticamente superiores, a implementação de controle sanitário e alimentação adequada (GONZALEZ; COSTA, 2012).

No entanto, algumas características genéticas necessárias de serem melhoradas são de difícil obtenção em virtude de: apresentarem baixa herdabilidade; expressarem-se tardiamente ou por dependerem do meio ambiente para se manifestar. Dessa forma, é imprescindível o aumento da eficiência e da pressão de seleção nas metodologias tradicionais de melhoramento genético (GUIMARÃES et al., 2010).

A existência de linhagens de ovinos brasileiros portadores de genes da prolificidade foi relatada nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Foi caracterizado um novo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no gene GDF-9 de ovinos Santa Inês sendo relacionado à alta frequência de múltiplas ovulações (CASTRO et al., 2006) e batizado como FecG-Embrapa (FecG^E) (AZEVEDO et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Para o entendimento do mecanismo integrado de ação endócrina e parácrina na atividade ovariana dos animais portadores de SNP são imprescindíveis os estudos sobre a fisiologia da foliculogênese, caracterizado pelo processo de recrutamento, seleção e dominância folicular. A visualização em tempo real por ultrassonografia durante as fases

de crescimento dos folículos recrutados em animais portadores do FecG^E, faz-se necessário para o monitoramento da dinâmica folicular e tem sido utilizada como ferramenta de estudo sobre a fisiologia.

O conhecimento do mecanismo da foliculogênese nos animais portadores de polimorfismos em genes relacionados à prolificidade a exemplo do FecG^E pode contribuir para melhorar o manejo reprodutivo, a exemplo da adequação de protocolos hormonais, horários da aplicação do sêmen em programas de inseminação artificial e aplicação de protocolos de múltiplas ovulações mais condizentes à fisiologia inerente dessas ovelhas mutantes. Esses procedimentos objetivam uma produtividade racional focada para atender a maior demanda de animais selecionados para reposição de rebanhos, de carne, de pele e de embutidos oriundos dessa atividade, proporcionando maior disponibilidade de mão de obra para o homem do campo e técnicos e, abrindo novas linhas de investigação para os pesquisadores da área.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Característica e perfil endócrino do ciclo estral na ovelha

A atividade reprodutiva padrão de ovelhas adultas é comandada por dois ritmos distintos. O primeiro constitui um ciclo estral de duração média entre 16 a 17 dias. O segundo segue um ritmo anual da ciclicidade do ovário caracterizado por uma cessação dependente da temporada (anestro) e sua restauração (estação reprodutiva) (ROSA; BRYANT, 2003). Essa característica confere ao ovino (*Ovis aries*) ser uma espécie com a reprodução marcadamente sazonal. Entretanto havendo a ocorrência de vários ciclos ovulatórios fisiológicos dentro da sua estação sexual climática favorável.

O padrão de atividade sexual cíclica se expressa geralmente quando o fotoperíodo diminui, ou seja, após o solstício de verão. Dessa forma, o início da atividade reprodutiva desses animais ocorre através do reconhecimento pelo seu eixo hipotalâmico das variações do comprimento horas de luz diário (LYNCH et al., 1992). Sendo que a característica do ciclo estral ovino compreende as alterações fisiológicas e comportamentais apresentadas pela fêmea sob influência do metabolismo hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal em tempo determinado (MORELLO; CHEMINEAU, 2004).

A divisão tradicional do ciclo estral acontece em fases distintas. O pró-estro é o período que precede o comportamento de estro e é caracterizado pela regressão lútea e pela emergência e crescimento do folículo ovulatório. O estro é a fase da receptividade sexual e

aceitação da cobertura pelo macho por parte da fêmea. Nas ovelhas a duração do estro é entre 24 a 48 horas (BINDON et al., 1979; GOODMAN, 1994) sendo que a ovulação ocorre em 24 a 30 horas após o início da exteriorização clínica do comportamento de estro (ROBERTSON, 1969). Na fase de metaestro ocorre o rompimento do folículo maturo e a ruptura de vasos sanguíneos, dessa forma havendo o preenchimento de sangue na sua cavidade, formando o corpo hemorrágico. O momento seguinte, com a presença de pelo menos um corpo lúteo (CL) funcional e, conseqüentemente, abrangendo a fase do pico de secreção de progesterona plasmática, é referenciado como o diestro. Essas duas últimas fases são frequentemente denominadas de fase luteal do ciclo estral (KEYES et al., 1983).

Nos ovinos o desenvolvimento folicular acontece em ondas cujas emergências são determinadas pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Existe também uma complexa regulação parácrina no ovário, a qual atua junto ao FSH para determinar o número de folículos recrutados, os quais irão continuar o desenvolvimento até a maturação completa (FORTUNE, 2003; FABRE et al., 2006). A elevação nas concentrações plasmáticas de FSH é observada um a dois dias antes de cada onda. No momento seguinte, a presença do hormônio luteinizante (LH) contribui para a maturação folicular final e seu pico conduz à ovulação dos folículos pré-ovulatórios, ocasionando a formação do CL (DUGGAVATHI et al., 2003b; MORELLO; CHEMINEAU, 2004).

Em um ciclo estral fisiológico, um *pool* de folículos primordiais é recrutado e estes iniciam o seu desenvolvimento até que o maior ou os maiores bloqueiam o final do desenvolvimento dos outros menores. Os achados experimentais evidenciam que este mecanismo, denominado dominância, ocorre durante a primeira e a última onda folicular (ovulatória). O folículo dominante é dependente em sua fase final do aumento da pulsatilidade do LH e, esse fato, impede sua atresia e o recomeço de uma nova onda folicular (BAIRD; MCNEILLY, 1981; MCNEILLY et al., 1991; GINTHER et al., 1995).

O mecanismo endócrino do ciclo estral de ovelhas pode ser assim esquematizado: quando a percepção da diminuição dos sinais luminosos é captada pelos fotorreceptores dos olhos é transmitida pelo sistema nervoso central para o hipotálamo e, depois para a glândula pineal. Esta converte o sinal nervoso em um ritmo circadiano de secreção de melatonina que estimula o hipotálamo a secretar, de forma pulsátil, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual estimula a síntese e a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior. O FSH e o LH atuam em ciclo de *feedback* positivo ao nível de ovário promovendo respectivamente o crescimento e a maturação dos folículos selecionados. No momento da formação do

folículo dominante (de Graaf) ocorre a maior concentração da liberação de hormônios esteróides como o estrógeno e a glicoproteína inibina que atuam em ciclo de *feedback* negativo com a liberação do FSH para a emergência de nova onda folicular. Após a ovulação, à medida que o CL se desenvolve, a elevada concentração de progesterona (P4) plasmática modula o desenvolvimento folicular de maneira que o próximo pico de LH induza à formação de um CL funcional e iniba a secreção endometrial da prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) nos primeiros dias da fase lútea. Em torno do 14º dia, não tendo sido estabelecida a gestação, a estimulação da ocitocina mediada pelos seus receptores endometriais, aumenta a conversão do ácido aracdônico para PGF $_{2\alpha}$ e sua liberação resulta na luteólise, reduzindo os níveis séricos de P4 (LYNCH et al., 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004) (Figura 1).

1.2. Foliculogênese

1.2.1. Estrutura ovariana

Os ovários são órgãos sexuais reprodutivos das fêmeas e têm como principais funções a produção e liberação de células germinativas femininas, a gametogênese, e a produção de hormônios sexuais, a esteroidogênese (ADONA et al., 2013).

A estrutura ovariana é composta por duas regiões, uma externa ou cortical e uma interna ou medular. Na primeira localizam-se os folículos ovarianos, os quais, em detrimento da fase do ciclo reprodutivo da fêmea, apresentam-se em diferentes estágios de crescimento: folículos primordiais, primários, secundários, terciários e préovulatórios (de Graaf). No momento da ovulação o folículo ovulatório se rompe, o ovócito maturo é liberado e forma-se o corpo hemorrágico. Após esse evento é formado o corpo lúteo e decorrida a luteólise são produzidos e visualizados os *corpus albicans* (LIU et al., 2006). A segunda região é constituída por tecido conjuntivo frouxo, células da musculatura lisa, nervos, vasos linfáticos, artérias e veias, estruturas as quais se prolongam para o córtex ovariano nutrindo e sustentando o ovário (CORMACK, 1991) (Figura 2).

1.2.1. Fases da foliculogênese

A foliculogênese inicia na vida pré-natal na maioria das fêmeas e pode ser definida como o processo de recrutamento, seleção e dominância folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). De um modo geral pode ser dividida em três fases caracterizadas pelos seguintes eventos: (1) crescimento do folículo pré-antral: transição do folículo primordial em primário e formação e crescimento dos folículos secundários; (2) crescimento do

folículo antral basal: formação do antro e desenvolvimento do folículo antral inicial em estágio dependente de gonadotrofina; (3) crescimento terminal do folículo antral: desenvolvimento do folículo antral préovulatório (SILVA et al., 2009).

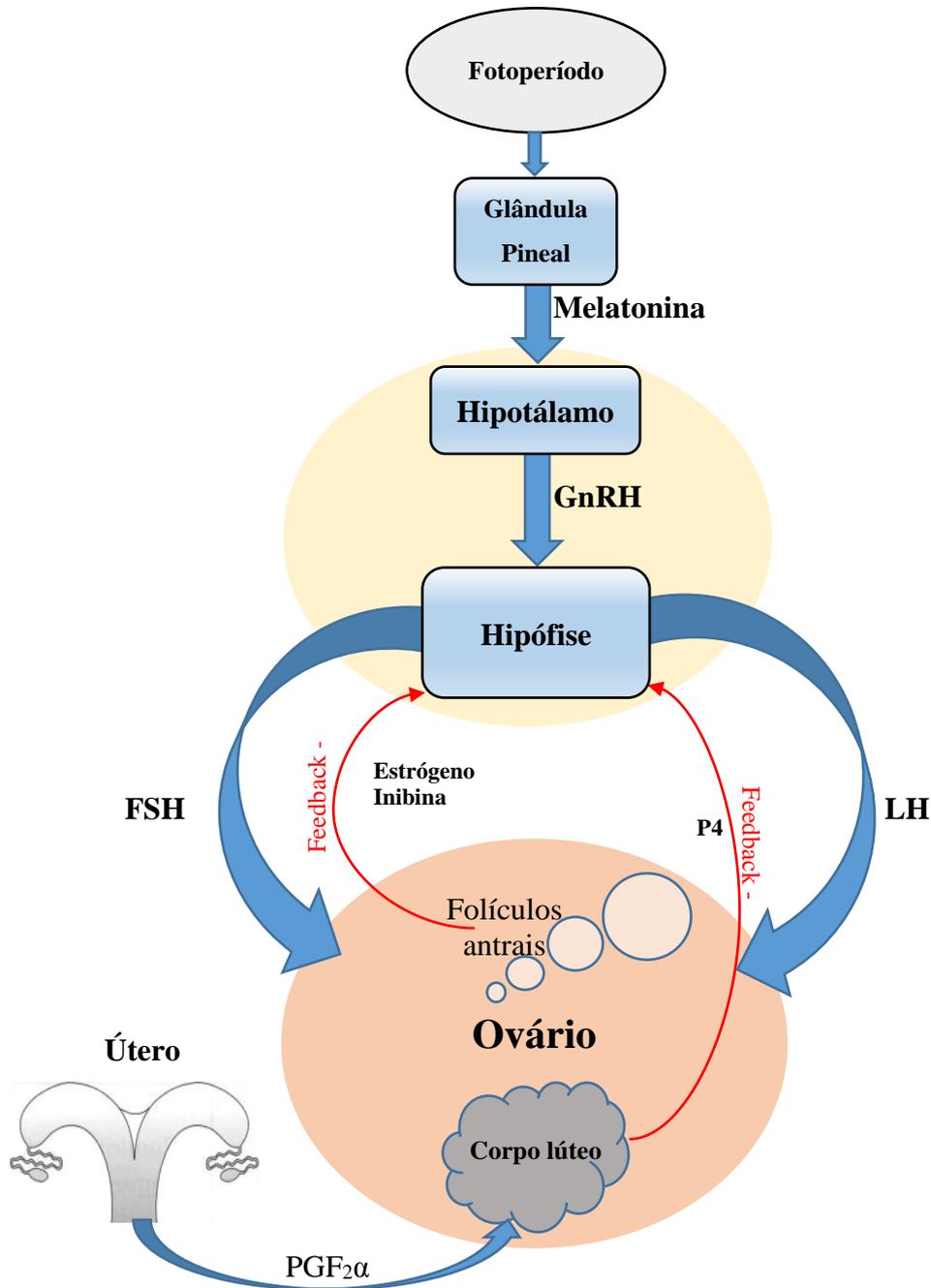


Figura 1. Mecanismo da ação endócrina no ciclo estral de ovinos (Fonte: Arquivo pessoal).
(GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; FSH = hormônio foliculo estimulante; LH = hormônio luteinizante; P4 = progesterona; PGF₂α = prostaglandina F₂α).

A ativação, ou seja, a saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência, que significa a passagem dos folículos do *pool* de reserva para a fase de crescimento é a primeira e essencial etapa, em que os folículos primordiais deixam o estágio de repouso e

iniciam seu crescimento do estágio de primordial até o tamanho préovulatório ou atresia (MARTINS et al., 2008).

O processo de ativação dos folículos primordiais é caracterizado pelo reinício da proliferação das células da granulosa e à medida que o ovócito cresce essas se diferenciam e mudam de categoria transformando-se de células achatadas para cubóides. Quando alguns desses folículos apresentam células do tipo pavimentosas e cúbicas são denominados folículos de transição (BRAW-TAL, 2002).

Na segunda fase ocorre o aumento do número de células da granulosa e, isto é acompanhado por um aumento no tamanho do ovócito. A classificação de folículos primários ocorre no momento em que o ovócito é circundado por somente uma camada de células da granulosa com formato cubóide. A progressão do folículo primário ao estágio secundário é definida pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa em formato cubóide e pela deposição inicial do material da membrana pelúcida ao redor do ovócito. Nesse estágio as células da teca são formadas em torno da membrana basal (FAIR, 2003; SILVA et al., 2004).

Durante o crescimento folicular pré-antral ocorre a formação das junções GAP, que são projeções para dentro do ovócito, as quais permitem a sua comunicação com as células da granulosa que o envolvem. Por intermédio das mesmas ocorre o transporte de aminoácidos, metabólitos e moléculas sinalizadoras que são essenciais para o seu desenvolvimento (GILCHIST; THOMPSON, 2007).

O crescimento folicular da fase secundária à terciária ocorre pela intensiva proliferação das células da granulosa. Nesse estágio os folículos também são conhecidos como antrais, por apresentarem o antro, cavidade repleta de líquido folicular no interior das multicamadas de células da granulosa. A última fase do desenvolvimento folicular é caracterizada por um ovócito circundado por células da granulosa especializadas denominadas células do *cumulus* e os folículos denominados como préovulatórios ou de Graaf (VAN DEN HURK ; ZHAO, 2005) (Figura 2).

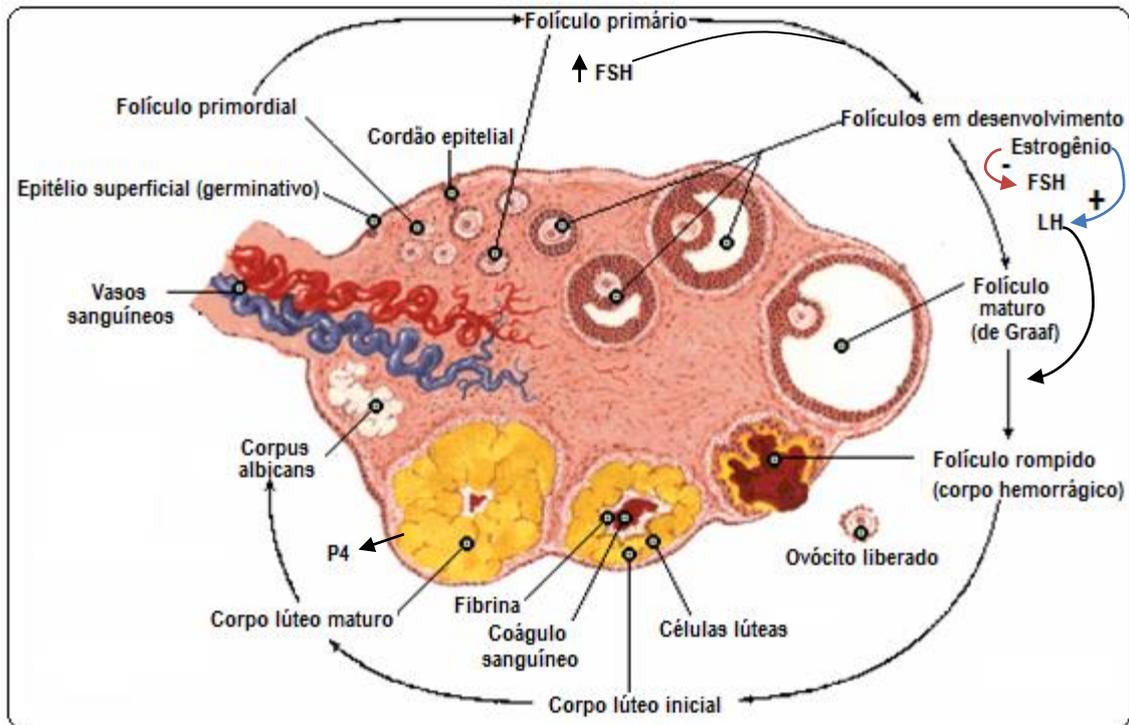


Figura 2. Esquema da estrutura e fisiologia ovarianas em ovinos. Adaptado de Utiger (2014).
(FSH = hormônio folículo estimulante; LH = hormônio luteinizante; P4 = progesterona).

1.2.3. Fisiologia da foliculogênese

O modelo atual de classificação do desenvolvimento folicular apresenta-se mais amplamente integrado aos eventos morfológicos, moleculares e celulares durante a foliculogênese. Incorpora também o conhecimento sobre os fatores que influenciam a qualidade do ovócito e seu papel na regulação do desenvolvimento folicular e taxa de ovulação (SCARAMUZZI et al., 2011).

Nos mamíferos o mecanismo geral da foliculogênese ovariana demanda uma complexa comunicação endócrina entre o sistema nervoso central e o ovário sob o controle de hormônios gonadotróficos e somatotróficos e por fatores de crescimento, sendo que esses últimos atuam direta ou indiretamente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto o domínio de conhecimento sobre o mecanismo de controle do número de folículos ovulatórios em cada ciclo encontra-se ainda pouco elucidado (FABRE et al., 2006; MARTINS et al., 2008).

Na maioria dos casos o desenvolvimento de um folículo dominante ocorre quando o nível de FSH atinge um determinado limiar sérico durante o ciclo. O período o qual esse nível de FSH permanece acima do limiar sérico, abre uma “janela” estreita permitindo que um folículo suficientemente amadurecido escape da atresia e passe pela sua seleção para alcançar a ovulação (VINET et al., 2012). A teoria da “janela” se baseia também na

hipótese de que os maiores folículos em crescimento em uma onda secretam a inibina e o estradiol, o que representa uma retroalimentação negativa para que o sistema hipotálamo - hipofisiário reduza os níveis séricos de FSH. Nesse contexto de redução das concentrações de FSH, apenas alguns folículos selecionados conseguem sustentar seu crescimento. Esses são chamados folículos selecionados e potencialmente podem tornar-se atresícos, se um CL estiver presente e secretar progesterona o que reduz a frequência dos pulsos de LH. Na ausência de um CL uma onda ovulatória pode emergir e os folículos dominantes podem ovular depois de um pico de LH, sendo este um dos principais modelos endócrinos do controle de ovulações múltiplas (SCARAMUZZI et al., 2011). O fenômeno fisiológico de mais de uma ovulação pode ser conseguido com o aumento do FSH circulante e/ou incremento da responsividade folicular a essa gonadotrofina, dessa forma, aumentando o *pool* de folículos em crescimento e, abrindo uma “janela” maior de seleção (VINET et al., 2012) (Figura 3).

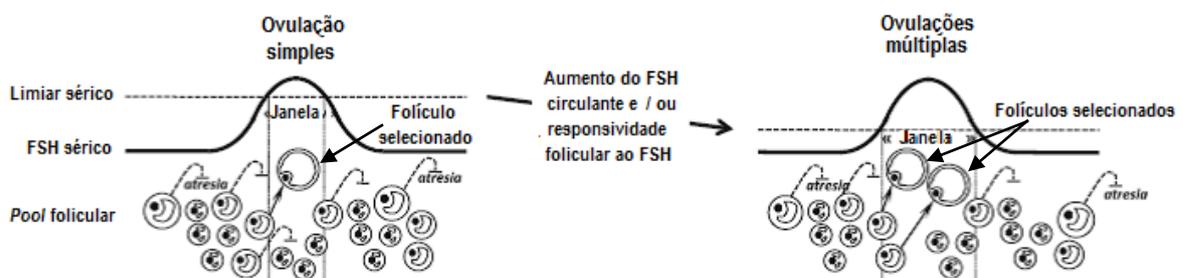


Figura 3. Modelo da teoria da “janela” adaptado de Vinet et al. (2012).
(FSH = hormônio foliculo estimulante)

Além dessa forma clássica pela estimulação das gonadotrofinas hipofisiárias que são reguladas por retroalimentação dos hormônios produzidos pelos ovários, preponderantemente os esteróides e a inibina, a foliculogênese também sofre regulação parácrina, através de fatores de crescimento produzidos dentro do próprio ovário pelos diversos tipos celulares nele contidos (SCARAMUZZI et al., 1993; HANRAHAN et al., 2004; HUNTER et al., 2004).

Os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF I e II) estão presentes nas diversas etapas da foliculogênese, atuando de forma direta e/ou indireta na promoção do desenvolvimento folicular (LEITÃO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2012). Monniaux; Pisselet (1992) descreveram que o IGF-I em ovelhas promove essencialmente a proliferação das células da granulosa de folículos pequenos em torno de 1 a 3 mm e em

folículos maiores que 5 mm de diâmetro estimulando a secreção de progesterona nas células da granulosa.

Existe uma heterogeneidade na localização de expressão do IGF no ovário entre as espécies (MONGET et al., 2002). Nos ovinos, a expressão de níveis significativos de IGF-I é maior nos folículos pequenos (gonadotrofina - independente) do que em folículos grandes (gonadotrofina-dependente). Também foi descrita a sua atividade no incremento da proliferação das células da granulosa, na esteroidogênese e no crescimento do ovócito (SILVA et al., 2009).

Uma grande quantidade de fatores de crescimento é produzida pelas células somáticas ovarianas e pelos ovócitos e funcionam como reguladores de desenvolvimento intraovariano. Os principais são os pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento transformadores beta (TGF-beta), sendo o Fator de Crescimento de Diferenciação 9 (GDF9) e a Proteína Morfogenética do Osso 15 (BMP15) os principais. Esses são expressos pelo ovócito a partir das fases iniciais da foliculogênese e estimulam o desenvolvimento do ovócito e a proliferação acelerada das células da granulosa que, por sua vez, também iniciam a síntese desses fatores, transformando-se em uma unidade autônoma (BRAW-TAL, 2002; KNIGHT; GLISTER, 2006).

A fertilidade em fêmeas de mamíferos depende da capacidade dos ovários para produzir folículos de Graaf, os quais podem ovular ovócitos fertilizáveis durante um ciclo reprodutivo. A foliculogênese demanda a coordenação e regulação de genes que controlam o crescimento do folículo, a progressão celular no ciclo e a ocorrência de apoptose (RICHARDS, 1995).

Dentre esses genes foram identificadas as das proteínas GDF9 e BMP15 sendo essa última também conhecida como fator de crescimento de diferenciação-9B - GDF-9B, as quais são membros da superfamília do fator de crescimento transformante b (TGF-b). Em ovelhas o BMP-15 mostrou estar expresso principalmente em ovócitos de folículos primários avançados, sendo considerado como um potente regulador da função ovariana. Entretanto, o GDF9 e seu ácido ribonucleico (RNA mensageiro) foram identificados em ovócitos de folículos primordiais, dessa forma essa proteína é denominada como uma molécula reguladora que tem influência direta nas atividades fisiológicas importantes ao longo da foliculogênese, isto é, desde o processo de ativação de um folículo primordial e seu posterior avanço para o *pool* de folículos em crescimento por meio de uma via de sinalização de comunicação parácrina entre os ovócitos, as células da granulosa e as células do *cumulus* (BODENSTEINER et al., 1999; ERICKSON; SHIMASAKI, 2000;

GALLOWAY et al. , 2000; DAVIS, 2004; JUENGEL et al., 2004; HANRAHAN et al., 2004).

Evidências de estudos *in vitro* sugerem que o GDF9 e o BMP15 atuam em um mecanismo complexo de estimulação à proliferação e a esteroidogênese nas células da granulosa. Como estão presentes no fluido folicular sua imunização interfere em suas ações impedindo o crescimento folicular normal, além das fases primordiais ou primárias (McNATTY et al., 2005; McNATTY et al. 2006a SCARAMUZZI et al., 2011).

O modelo de ação do GDF9 e do BMP15 no desenvolvimento de folículos durante a foliculogênese pode ser assim descrito: a partir do ovócito esses genes desencadeiam vias de transdução de sinal do receptor de células foliculares. Um mecanismo complexo e altamente integrado da foliculogênese é estabelecido, envolvendo interações entre as células da granulosa e os ovócitos em desenvolvimento nos folículos e, indicando as vias de diferenciação das células da granulosa (células do *cumulus* e células da granulosa murais). Até à formação do antro, os ovócitos e as células da granulosa estão intimamente associados por sinal entre eles via junções-GAP e com os fatores de crescimento como GDF9, BMP15 e o kit ligand (fator de células tronco - FCS - ou fator de crescimento multipotente) comandados por mecanismo parácrino. Da formação do antro em diante, os ovócitos exercem um papel crítico pela secreção principalmente do GDF9 e BMP15, com o objetivo de evitar a luteinização das células da granulosa do ovócito vizinho. Durante a fase antral os fatores secretados pelos ovócitos também continuam a atuar em células da granulosa murais para promover a atividade mitogênica e, inibir simultaneamente a luteinização. Por sua vez, os dois tipos de células da granulosa, mas, em especial, as células do *cumulus*, estimulam o ovócito com fatores parácrinos, vários metabólitos e moléculas reguladoras como o Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC), necessários para o ovócito adquirir capacidade de desenvolvimento no folículo (ERICKSON; SHIMASAKI, 2000; SCARAMUZZI et al., 2011) (Figura 4).

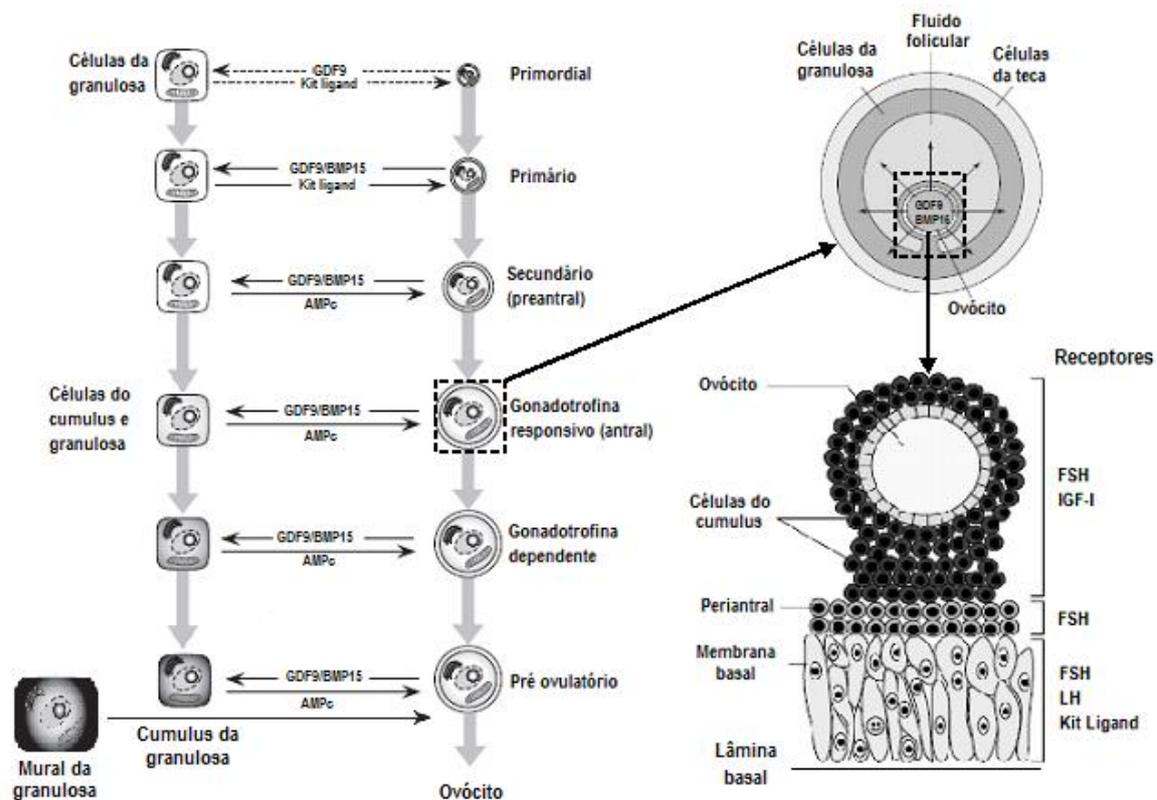


Figura 4. Mecanismo da ação parácrina na foliculogênese. Adaptado de Erickson; Shimasaki (2000) ; Scaramuzzi et al.(2011).

(AMPc = monofosfato cíclico de adenosina; FSH = hormônio folículo estimulante; IGF-I = fator de crescimento semelhante a insulina I; LH = hormônio luteinizante)

1.3. Dinâmica folicular

Os avanços em análises de imagens vêm proporcionando uma revolução silenciosa em abordagens de pesquisa para o estudo da estrutura e função ovariana. As alterações mais significativas visualizadas na fisiologia do ovário resultaram do uso de ultrassonografia, o que permitiu análises sequenciais não invasivas em animais vivos (SINGH et al., 2003). Os primeiros trabalhos utilizando o advento das imagens ultrassonográficas em escala de cinza (modo-B) em reprodução animal datam de 1980, um século depois da descoberta do efeito eletrônico dos cristais (GINTHER, 2014).

À medida que ocorre o desenvolvimento folicular, pode-se observar através de imagens ultrassonográficas uma alta variabilidade dos parâmetros numéricos (número de ondas por ciclo e de folículos por onda). Em ovelhas constatou-se a existência de mais de uma onda folicular durante a fase luteínica e a ocorrência de apenas uma onda na fase folicular culminando com a ovulação, num ritmo de três a cinco ondas durante o ciclo estral (DRIANCOURT, 1991; 2001). O padrão da onda no desenvolvimento dos folículos antrais é manifestado pelo crescimento sincronizado de um a quatro pequenos folículos (2

a 3 mm de diâmetro), com capacidade para alcançar o tamanho ovulatório em ambos os ovários. Mesmo que a fêmea apresente quatro ondas de crescimento folicular por período interovulatório, isto não aumenta o comprimento do ciclo por incorporar uma onda extra, uma vez que, os sucessivos intervalos entre as ondas são reduzidos. Além disso, a linha de pensamento a qual os grandes folículos ovarianos não exercem efeito inibitório sobre o desenvolvimento dos folículos antrais menores vem sendo considerada, pois mesmo na presença de um folículo dominante observa-se a ocorrência de uma nova emergência folicular (BABY; BARTLEWSKI et al., 2011).

Acompanhando a dinâmica folicular em sete cordeiras de 13 a 15 meses, Ali et al. (2006) detectaram a ocorrência de duas e três ondas foliculares em 35% e 65% dos períodos estudados, respectivamente.

Segundo Seekallu et al. (2010) a fase de crescimento folicular e o tempo de vida do maior folículo em crescimento até a onda ovulatória foram superiores em ciclos de três do que de quatro ondas, sendo que os comprimentos dos ciclos estrais foram de $17,11 \pm 0,3$ e $17,20 \pm 0,2$ dias para ciclos com três ou quatro ondas foliculares, respectivamente.

A ultrassonografia permite a visualização do desenvolvimento folicular que pode ser classificado em três fases distintas. A fase do recrutamento folicular é caracterizada pelo surgimento de folículos pequenos (entre 2 e 4 mm). Na fase da seleção continua o crescimento dos folículos selecionados (entre 4 e 5 mm). Os demais folículos da onda regridem e entram em atresia, enquanto que os de maior crescimento (> 5 mm) se desenvolvem até ovularem (onda ovulatória) ou regridem e entram em atresia. Os folículos intermediários não variam quanto ao número ao longo do período interovulatório, enquanto que a quantidade de folículos maiores (≥ 5 mm) aumenta no início desse período, diminuem no momento intermediário e voltam a aumentar nas ondas finais próximas à ovulação (DRIANCOURT, 2001; DUGGAVATHI et al., 2003a; ALI et al., 2006; TOOSI et al., 2009).

Segundo Duggavathi et al. (2003b), com o auxílio de equipamento ultrassonográfico de alta resolução, foi possível identificar folículos de 0,4 mm e quantificar todos os folículos antrais de 1 mm de diâmetro. Os autores visualizaram o surgimento de folículos pequenos (1 a 3 mm de diâmetro), um dia antes da ocorrência da ovulação do ciclo anterior indicando baixa relação entre o recrutamento e dominância folicular. Verificaram também que aproximadamente três a cinco dias foi o período de duração das ondas foliculares e que o número de folículos pequenos é homogêneo ao longo das emergências das ondas.

O uso da ultrassonografia para a detecção precoce do CL é essencial para a determinação do momento ovulatório, além de possibilitar a caracterização da formação de um CL funcional através da diferenciação da ecotextura e da mensuração da sua área (DUGGAVATHI et al., 2003a). O dia da ovulação pode ser definido como o dia em que um folículo que apresente mais de 5 mm de diâmetro, o qual tenha sido anteriormente identificado e não mais visualizado (TOOSI et al., 2009).

A dinâmica folicular préovulatória e a taxa de ovulação foram avaliadas durante a época de reprodução em 20 ovelhas prolíficas (W) e 20 não prolíficas (AB) oriundas da raça Barbarine, como base para estudo da influência da seleção genética na prolificidade desses animais. As ovelhas do grupo W apresentaram maior quantidade de folículos médios (3,5 a 5,4 mm de diâmetro) 24 horas antes do estro em comparação às do grupo AB. As médias das taxas de ovulação foram $1,8 \pm 0,8$ e $1,1 \pm 0,3$, respectivamente, para as fêmeas do grupo W e AB (LASSOUED et al., 2013).

2.4. Fertilidade de fêmeas ovinas portadoras dos genes da prolificidade

Os avanços da Biologia Molecular permitiram correlacionar, de forma direta, a variabilidade fenotípica de uma determinada característica com a variabilidade genética do indivíduo, através da identificação de pontos do genoma (marcadores moleculares) correspondentes, evitando a influência do meio na seleção genética. A partir desse ponto foram identificados polimorfismos genéticos, que são alterações espontâneas no genoma (mutações) capazes de expressar diversos fenótipos em indivíduos de uma mesma espécie (GUIMARÃES et al., 2010).

Diversos estudos sobre a genética, relacionada à prolificidade em ovinos, têm sido realizados em vários pontos geográficos do planeta destacando a importância dos três genes principais: BMPR-1B, BMP15, GDF9. Novos genótipos oriundos de polimorfismos desses genes têm mostrado influência na taxa de ovulação e número de crias nascidas desencadeadas por diferentes mecanismos, conforme descrito a seguir.

Em fêmeas mamíferas o GDF 9 e o BMP 15 são proteínas produzidas pelo próprio ovócito e têm as células da granulosa como sítio principal de secreção (FORTUNE, 2003). Esses fatores de crescimento têm sido alvo de estudos científicos e foram os primeiros a serem analisados, expressos pelo ovócito, que participam do controle das fases iniciais da foliculogênese, proliferação das células da granulosa e da teca em mamíferos. Esses marcadores moleculares desempenham um papel central na determinação do número de ovulações sendo relacionados com a prolificidade em ovinos de diversas raças que

apresentam histórico de elevada incidência de partos duplos e triplos (GALLOWAY et al., 2002; HANRAHAN et al., 2004; MOORE et al., 2004; SHIMASAKI et al.; 2004; MCNATTY et al., 2005).

Com a identificação e a definição do papel fisiológico das proteínas, BMP-15 e GDF-9, dois novos importantes conceitos foram gerados. Primeiro, quando proteínas da família da BMP, originalmente descritas como indutoras de osteogênese e condrogênese e, envolvidas nos eventos iniciais do desenvolvimento celular, passam a representar um sistema chave no controle da foliculogênese e da taxa de ovulação, quando em interação com as gonadotrofinas ou com os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs). Segundo, quando o ovócito, através da ação das suas proteínas específicas secretadas durante o crescimento folicular, atuam no controle do número de folículos que irão ovular (PRAMOD et al., 2013).

Em ovelhas prolíficas da raça Merino Australiana portadoras da mutação FecB^B do gene receptor da proteína morfogenética do osso tipo -1B (BMPR-1B), a principal característica é a maturação precoce dos folículos ovarianos, aumentando a sua sensibilidade ao FSH e não o aumento de suas concentrações séricas. Nessas fêmeas os folículos ovulatórios apresentam um diâmetro menor, porém, em maior número do que nas do tipo selvagem. Há evidências que a família da BMP tem um papel maior na modulação, proliferação e na diferenciação das respostas das células da granulosa e da teca à estimulação das gonadotrofinas (CAMPBELL et al., 2008; FORGATY, 2009).

Na Índia, foi realizado estudo por Kumar et al. (2008) para avaliar a introgressão do polimorfismo FecB em ovelhas mestiças Garole × Malpura (GM), de origem local. Um total de 235 cordeiros GM foram selecionados aleatoriamente para a verificação da mutação FecB, sendo que 69,8% foram constatados portadores da mesma. Os resultados encontrados indicaram que essa seleção ocasionou um incremento no número de crias nascidas.

Chu et al. (2010) relataram que uma nova mutação de nucleotídeo simples (F729T) do gene GDF-9, foi associada com alta prolificidade em algumas raças ou tipos raciais de ovelhas chinesas e, ponderaram que a introdução de animais comprovadamente mutantes para o gene GDF-9 em algumas raças de ovelhas não prolíficas pelo sistema de cruzamento pode melhorar as características reprodutivas. Entretanto, ainda existem algumas contradições com relação à presença desses e outros polimorfismos em ovinos (VACCA et al., 2010). Segundo estes últimos pesquisadores, em cinco raças ovinas criadas na Tunísia confirmadas como prolíficas, como a Barbarine, Queue Fine de L'Ouest, Noire de Thibar,

Sicilo-Sarde e D'man, não foram detectadas nenhuma das mutações genéticas já estudadas e ligadas à prolificidade.

Foi realizado um experimento por Monteagudo et al. (2009) com objetivo de buscar possíveis mutações no GDF9 e BMP15 associadas com o aumento da taxa de fertilidade em ovinos da raça Aragonesa cuja prolificidade média é de 1,2 a 1,5. Foram selecionadas 12 ovelhas altamente prolíficas, com média de 3,67 cordeiros nascidos por parto, no decorrer de três parições sendo que o resultado encontrado foi uma nova variante do BMP15, que recebeu a nomenclatura FecX^R.

Abdoli et al. (2013) realizaram um mapeamento genético para a identificação de polimorfismos dos genes relacionados à prolificidade em um total de 100 ovelhas da raça Mehraban. Os autores detectaram a seguinte situação para a ocorrência das mutações: os três genótipos (AA, AG e GG) para mutação do exon 1 do gene GDF9 não tiveram efeito significativo sobre as características de reprodução e a mutação do alelo A do exon 8 para o gene BMPR-1B teve efeito altamente significativo na fertilidade, quanto ao número de cordeiros nascidos, sendo considerada uma nova e importante mutação relacionada ao aumento da performance reprodutiva dessas ovelhas.

Na mutação FecG^E do gene GDF-9 em ovinos da raça Santa Inês, os que são do tipo selvagem não possuem alteração no número de ovulações. Entretanto, os animais heterozigotos, que possuem a mutação, apresentam uma maior prolificidade, pois pode ocorrer uma relação da expressão do polimorfismo com um possível aumento do número de ovulações. (CASTRO et al., 2008). Desse trabalho não se pôde ter uma conclusão a respeito da fertilidade das ovelhas homozigotas para a mutação.

Silva et al. (2010) compararam registros do número de crias nascidas de 334 ovelhas da raça Santa Inês em um período de seis anos com genotipagens feitas por PCR-RFLP para identificação de um novo polimorfismo denominado de FecG^E. A comparação evidenciou um efeito significativo do genótipo FecG^E sobre o número de partos gemelares por ovelha, sendo que aquelas mutantes em homozigoze apresentaram 44% de gestações gemelares, enquanto que, nenhum parto gemelar foi observado em ovelhas homozigotas não mutantes. Quando comparado com o genótipo selvagem, houve um aumento de um CL extra e de 58% a mais no número de cordeiros nascidos em ovelhas mutantes homozigotas, o que, segundo os autores, representou uma forte evidência do efeito da FecG^E sobre o controle da taxa de ovulação e prolificidade, além de ter sido o primeiro relato de fertilidade de fêmeas mutantes homozigotas oriundas de polimorfismos no GDF9 em ovinos.

2. REFERÊNCIAS

ABDOLI, R.; ZAMANI, P.; DELJOU, A.; REZVAN, H. Association of BMPR-1B and GDF-9 genes polymorphisms and secondary 3 protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. Publicado em 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.133>. Acesso em: 10/04/2014

ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; MIRANDA, M. S.; OHASHI, O. M. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **Cient. Ciênc. Biol. S.**, v.15, n. 3, p. 245-50, 2013.

ALI, A.; DERAR, R.; H. HUSSEIN. Seasonal variation of the ovarian follicular dynamics and luteal functions of sheep in the subtropics. **Theriogenology**, v. 66, 463-469, 2006.

AZEVEDO, H. C.; OLIVEIRA, A. A.; MUNIZ, E. N.; PAIVA, S. R.; FRANCO, M. M.; MELO, E. O. Embrapa Tabuleiros Costeiros produz rebanho de ovelhas Santa Inês com maior prolificidade. Publicado em 22/12/2010. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?Idpagina=artigos&artigo=6342&showaquisicao=true>> Acesso em: 07/04/2014.

BAIRD, D. T.; MCNEILLY, A. S. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. **J. Reprod. Fertil.**, v. 30, p.119-133, 1981.

BABY, T. E.; BARTLEWSKI, P. M. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. **Reprod. Biology.**, v.11, n.1, p.19-36, 2011.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. **A. Reprod. Sci.**, v. 65, p. 231-244, 2001.

BINDON, B.M.; BLANC M. R.; PELLETIER J.; TERQUI, M.; THIMONIER, J. Perioovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. **J. Reprod. Fertil.**, v. 55, p.15-25, 1979.

BODENSTEINER, K. J.; CLAY, C. M.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biol. Reprod.**, v. 60, p.381-386, 1999.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 187, p. 11-18, 2002.

CAMPBELL, B.K., MARSTERS, P., BAIRD, D.T. The mechanism of action of the FecB (Booroola) mutation. In: Proceedings of the International Booroola Workshop, November 10-12, 2008, Pune, India. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

CASTRO, E.A.; LOPEZ, I.M.R.; LIMA, A.; FRANCO, M.M; PAIVA, S.R.; SOUZA, C.J.H.; RUMPF, R. ; MELO, E.O. Characterization of a new SNP in the growth and differentiation factor 9 (GDF-9) gene, specific for the brazilian Santa Inês sheep. In: VIII WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, Belo Horizonte, p. 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, 2006.

CASTRO, E.A.; MARTINS, C.F.; MELO, E.O. Estudo molecular no controle da taxa de ovulação em ovinos da raça Santa Inês. **Univ. Ci. Saúde**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2008.

CHU, M. X.; YANG, J.; FENG, T.; CAO, G. L.; FANG, L.; DI, R.; HUANG, D. W.; TANG, Q. Q.; MA, Y. H.; LI, K; LI, N. GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. Publicado em 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0670-5>. Acessado em 10/04/2014.

CORMACK, D.H. O sistema reprodutor feminino. In: CORMACK, D.H. Ham Histologia, 9a edição, Ed. Guanabara Koogan, Brasil, p. 485-508, 1991.

COSTA, J.A.A.; CARDOSO, E.E.; REIS, F.A.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, W.C. Perspectivas da pesquisa em ovinocultura no Centro-Oeste. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2011. 67 p.; 21 cm. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X; 184).

- DAVIS, G. H. Fecundity genes in sheep. **A. Reprod. Sc.**, v. 82-83, p. 247-253, 2004.
- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P. M.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N.C. Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological and functional correlates. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 634-639, 2003a.
- DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI P.M.; BARRETT, D.M.W.; RAWLINGS, N.C. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, p.495-510, 2003b.
- DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p.55-79, 1991.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p.1211-39, 2001.
- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The Role of the Oocyte in Folliculogenesis. **TEM**, vol. 11, n. 5, p. 193 – 198, 2000.
- FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; DIPAQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 4, n. 20, p. 1-12, 2006.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **A. Reprod. Sci.** v. 78, n.3/4, p. 203-16, 2003.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of pre-antral follicles. **A. Reprod. Sci.**, v. 78, n. 3/4, p. 135-163, 2003.
- FOGARTY, N.M. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. **Small Rumin. Res.**, v. 85, p. 75-84, 2009.

GALLOWAY, S. M.; GREGAN, S. M.; WILSON, T.; MCNATTY, K. P., JUENGEL, J. L.; RITVOS, O.; DAVIS, G.H. Bmp15 mutations and ovarian function. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 191, p. 15-18, 2002.

GILCHIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p. 6-15, 2007.

GOODMAN, R.L. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: **The Physiology of Reproduction** (Editors: Knobil, E., Neill, J.D.), 2nd edition, Raven Press, New York, p. 660 - 693, 1994.

GONZALEZ, C.I.M.; COSTA, J.A.A. Índices de produtividade do rebanho. In: **Embrapa Gado de Corte**, (ed.). **Reprodução assistida e manejo de ovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2012. p. 29-31.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, 1995.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v.81, p.112-125, 2014.

GUIMARÃES, M.F.M.; MELLO, F.; FONSECA, I.; FREITAS, A.F.; ARBEX, W.A.; SILVA, M.V.G. Marcadores genéticos no melhoramento animal. Publicado em 02/12/2010. Disponível em: <http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/tecnico,36>
Acesso em: 26/06/2014

HAFEZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**, 7th edition, Williams ; Wilkins, USA, p. 20-58, 2004.

HANRAHAN, J.P.; GREGAN, S.M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G.H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth

factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biol. of Reprod.**, v. 70, p. 900-909, 2004.

HOLANDA, G. M. L.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. O gene da prolificidade em ovinos. **C. Vet. Tróp.**, v. 9, n. 2/3, p. 45-53, 2006.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G. E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **A. Reprod. Sci.**, n. 82 /83, p. 461- 477, 2004.

IBGE. PRODUÇÃO PECUÁRIA MUNICIPAL 2012, Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10/04/2014.

JUENGEL, J. L.; BODENSTEINER, K. J.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; MCNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **A. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 447- 460, 2004.

KEYES, P. L.; GADSBY, J. E.; YUH, K. C.; BILL, C.H. The corpus luteum. **Int. Rev. Physiol.**, v. 27, p. 57-97, 1983.

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

KUMAR, S.; MISHRA, A.K.; KOLTE, A.P.; ARORA, A.L.; SINGH, D.; SINGH, V.K. Effects of the Booroola (*FecB*) genotypes on growth performance, ewe's productivity efficiency and litter size in Garole×Malpura sheep. **A. Reprod. Sci.**, v., 105, p. 319-331, 2008.

LASSOUED, N.; REKIK, M.; GONZALEZ-BULNES, A.; BEN SALEM, I.; TOUNSI, A. Prolific strains of Barbarine sheep are characterized by increased ovulation rate due to extended period of ovulatory follicle recruitment and co-dominance effects. **Small Rum. Res.**, v. 114, p. 134-139, 2013.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Sci. Vet.**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.

LYNCH, J. J.; HINCH, G. N.; ADAMS, D. B. **The behaviour of sheep**. Wallingford : CAB International and East Melbourne ; Victoria : CSIRO Publications, 1992. 237 p.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Develop. Biol.**, v. 29, p. 1-11, 2006.

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E.T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T.F.P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 36, n.1, p.32-38, 2012.

McNEILLY, A. S.; PICTON, H. M.; CAMPBELL, B. K. Gonadotropic control of follicle growth in the ewe. **J. Reprod. Fertil.**, Supplement 23p.177 - 186, 1991.

MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; READER, K.; LUN, S.; HANRAHAN, J. P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 234, p. 57-66, 2005.

MCNATTY, K. P.; LAWRENCE, S.; GROOME, N. P.; MEERASAHIB, M. F., HUDSON, N. L.; WHITING, L.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L. Oocyte signalling molecules and their effects on reproduction in ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18, 403-412, 2006a.

MARTINS, F.S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. A.** , v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MONNIAUX, D; PISSELET, C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. **Biol. Reprod.**,v.46, p.109-19, 1992.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSÉN, J. M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Dom. A. Endocrinol.**, v. 23, p. 139-154, 2002.

MONTEAGUDO, L.V.; PONZ, R.; TEJEDOR, M.T.; LAVTNA, A.; SIERRA, I.A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. **A. Reprod. Sci.**, v. 110, p. 139-146, 2009.

MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. In: AISEN, E. G. **Reproduccion ovina y caprina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. Capítulo 2, p. 11 - 24.

MOORE, R. K.; G, F.; ERICKSON; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Endocrinol. Metab.**, v.15, n.8, p.356-361, 2004.

PRAMOD, R. K.; SHARMA, S. K.; KUMAR, R.; RAJAN, A. Genetics of ovulation rate in farm animals. **Veterinary World**, v.6, n.11, p. 833-838, 2013.

RICHARDS, J. S. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. **Rec. Prog. Horm. Res.**, v., 50, p. 223-254, 1995.

ROBERTSON, H. A. The endogenous control of estrus and ovulation in sheep, cattle, and swine. **Vitam. Horm.**, v. 27, p.91-130, 1969.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. The “ram effect” as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. **Small Rumin. Res.**, v.45, p. 1-16, 2002.

SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; AND TSONIS, C. G. A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 459-478, 1993.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; McNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VINOLES, C.; WEBBL, C. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 23, p. 444-467, 2011.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G.F. The bone morphogenetic protein system in Mammalian reproduction. **Endocrinol. Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.

SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **A. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 371- 399, 2003.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; DE MATOS, M. H. T.; DOS SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; DE FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology** ,v. 61, p. 1691-1704, 2004.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v.71, p. 1193-1208, 2009.

SILVA, B. D. M.; CASTRO, E. A.; SOUZA, C. J. H.; PAIVA, S. R.; PAIVA, S. R.; SARTORI, R.; FRANCO, M. M.; AZEVEDO, H. C.; SILVA, T. A. S. N.; VIEIRA, A.M. C.; NEVES, J. P.; MELO, E. O. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Anim. Genetics** (Print), v. 42, p. 89-92, 2010.

SEEKALLU, S. V.; TOOSI, B. M.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D. M. W.; DAVIES, K. L.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. **Theriogenology**, v. 73, p. 670-680, 2010.

TOOSI, B. M.; SEEKALLU, S.V.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. **Theriogenology**, v.72, p. 902-909, 2009.

UTIGER, R. D. Regulation of ovarian function. Encyclopaedia Britannica. Publicado em: 2014. Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/435788/ovary/285580/Regulation-of-ovarian-function> . Acessado em: 25/06/2014.

VACCA, G. M.; DHAOUADI, A.; REKIK, M.; CARCANGIU, V.; PAZZOLA, M.; DETTORI, M.L. Prolificacy genotypes at BMRP 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. **Small Rumin. Res.**, v. 88, p. 67-71, 2010.

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.

VINET, A.; DROUILHET, L.; BODIN, L.; MULSANT, P.; FABRE, S.; PHOCAS, F. Genetic control of multiple births in low ovulating mammalian species. **Mamm Genome**, v. 23, p.727-740, 2012.

3. ARTIGO

DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM OVELHAS SANTA INÊS PORTADORAS DO POLIMORFISMO FecG^E DO GENE GDF-9

1 Dinâmica folicular ovariana em ovelhas Santa Inês portadoras do polimorfismo
2 FecG^E do gene GDF-9 (Revista: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
3 Zootecnia)

4 Ovarian follicular dynamics in Santa Ines ewes carrying the polymorphism FecG^E
5 of GDF-9 gene

6 Halley Schuch Passos ¹. E-mail: halleypassos@gmail.com

7 ⁽¹⁾Universidade Federal de Sergipe – Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze,
8 São Cristóvão, SE - Brasil.

9 RESUMO

10 Este trabalho teve por objetivo o estudo da dinâmica folicular ovariana do período
11 interovulatório em ovelhas nulíparas da raça Santa Inês portadoras do polimorfismo
12 FecG^E. Foram utilizadas 21 ovelhas previamente genotipadas para o polimorfismo
13 FecG^E por PCR-RFLP. Os animais foram divididos em três grupos (n=7/grupo) de
14 acordo com o genótipo relacionado à mutação como segue: WW - selvagem não
15 mutante; EW - heterozigoto e; EE - homozigoto. A dinâmica folicular foi acompanhada
16 por ultrassom dentro de um período interovulatório. A captura e mensuração das
17 imagens dos ovários foram feitas a cada 24 horas até a detecção do estro, sendo
18 ajustadas para cada 12 horas até a ovulação. Foi verificado que 15 animais (71,42%)
19 apresentaram a emergência de três ondas e seis (28,58%) apresentaram quatro ondas de
20 crescimento folicular. Não houve influência do genótipo sobre o número de folículos
21 selecionados, ≥ 2 e ≤ 4 mm, ($2,8 \pm 0,7$) e dominantes, >5 mm, ($0,9 \pm 0,1$), o período
22 interovulatório ($17,5 \pm 0,2$) e, a duração do estro ($38,11 \pm 0,9$). O maior número de
23 ovulações foi observado nas ovelhas homozigotas ($2,4 \pm 0,2$) em relação às do tipo
24 selvagem ($1,7 \pm 0,2$) sendo as heterozigotas apresentando valor intermediário ($1,9 \pm$
25 $0,1$), porém não diferindo dos demais. Apesar dos grupos genéticos não diferirem
26 quanto ao intervalo entre o início do estro e a ovulação ($25,34 \pm 1,8$ h), foi verificada
27 alta variação individual entre as ovelhas dentro de cada genótipo. Ovelhas nulíparas
28 Santa Inês portadoras do polimorfismo FecG^E expressam diferenças no tempo de
29 sobrevivência folicular e no diâmetro do folículo ovulatório em relação às não mutantes,
30 sendo que o grupo genético homozigoto apresenta um maior número de ovulações.

31 **Palavras-chave:** ovinos, prolificidade, mutação, período interovulatório,
32 ultrassonografia.

33 **ABSTRACT**

34 This study aimed the study of ovarian follicular dynamics in a interovulatory period in
35 nulliparous Santa Inês sheep carrying the polymorphism FecG^E. Were used 21 sheep
36 that previously genotyped for FecG^E polymorphism by PCR-RFLP. The animals were
37 divided into three groups (n = 7 / group) according to the genotype mutation: WW -
38 non-mutant wild; EW – heterozygote and EE - homozygous. Follicular dynamics were
39 monitored by ultrasound within a period interovulatory. The capture and measurement
40 of the ovaries images were made every 24 hours until detection of estrus, being adjusted
41 to every 12 hours until ovulation. It was found that 15 animals (71.42%) showed the
42 emergence of three waves and six (28.58%) had four follicular waves. Don't were
43 influence of genotype on the selection, follicles ≥ 2 and ≤ 4 mm, ($2,8 \pm 0,7$) and
44 follicular dominance, follicles > 5 mm, ($0,9 \pm 0,1$), the interovulatory period ($17,5 \pm$
45 $0,2$) and the duration of estrus ($38,11 \pm 0,9$). The largest number of ovulations was
46 observed in homozygous sheep (2.4 ± 0.2) compared to the wild type (1.7 ± 0.2),
47 however, heterozygous presenting intermediate value (1.9 ± 0.1) but not differ from the
48 others. Despite genetic groups did as not differ to the interval between the onset of
49 estrus and ovulation ($25,34 \pm 1,8$), high individual variation was observed among sheep
50 within each genotype. Santa Inês sheep that carriers the polymorphism FecG^E express
51 some differences in ovarian follicular dynamics in relation to non-mutants, being
52 represented mainly by the largest number of ovulations in homozygous genetic group.

53 **Keywords:** Sheep, prolificacy, mutation, interovulatory period, ultrasonography.

54

55 **1. INTRODUÇÃO**

56 Um novo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no gene GDF-9 foi
57 caracterizado em ovinos Santa Inês, sendo relacionado à alta frequência de múltiplas
58 ovulações (CASTRO et al. 2006). A partir desse achado científico foi documentado pela
59 primeira vez no mundo um novo SNP para o gene GDF-9 que está relacionado à alta
60 taxa de ovulação e prolificidade em ovelhas homozigotas e que foi batizado como
61 FecG-Embrapa (FecG^E) (AZEVEDO et al., 2010; SILVA et al., 2010).

62 As informações sobre populações foliculares ao longo de um período
63 interovulatório obtidas por meio de imagens ultrassonográficas em ovinos
64 proporcionam um acompanhamento criterioso da foliculogênese caracterizada

65 basicamente pelo processo de recrutamento, seleção e dominância folicular. Estudos do
66 desenvolvimento folicular em ovelhas portadoras ou não de genes relacionados à
67 prolificidade têm demonstrado uma alta variabilidade nos parâmetros numéricos a
68 exemplo do número de ondas por ciclo estral que variam de três a cinco e de folículos
69 por onda (DRIANCOURT, 1991; 2001; DUGGAVATHI et al., 2003; ALI et al., 2006).

70 A comparação no padrão de crescimento folicular entre ovelhas prolíficas,
71 portadoras do polimorfismo FecB (gene Booroola), com não mutantes confirma a
72 existência de similaridade nas primeiras ondas foliculares e na fase lútea. Entretanto, o
73 aumento do número de ovulações é significativamente maior nas ovelhas portadoras
74 dessa mutação do que nas não portadoras (SOUZA et al., 1997; GONZALEZ-BÚLNES
75 et al., 2004).

76 O estudo do mecanismo da foliculogênese nos animais portadores de genes
77 relacionados à prolificidade pode contribuir para o melhoramento do manejo
78 reprodutivo, a exemplo da adequação de protocolos hormonais, horários da aplicação do
79 sêmen em programas de inseminação artificial e estudo para aplicação de protocolos de
80 múltiplas ovulações mais condizentes à fisiologia inerente dessas ovelhas mutantes. A
81 aplicação de procedimentos biotecnológicos adequados para animais FecG^E pode
82 contribuir para multiplicação e inserção de animais portadores desse genótipo nos
83 sistemas de produção. Esta mutação também pode ser disseminada por meio de
84 cruzamento de reprodutores FecG^E com fêmeas não mutantes, conforme executados em
85 ensaios experimentais realizados por Kumar et al. (2008) que realizaram a introgressão
86 do gene FecB em ovelhas mestiças Garole X Malpura

87 O presente experimento teve como objetivo o estudo das mudanças morfológicas
88 foliculares dentro de um período interovulatório completo em ovelhas nulíparas Santa
89 Inês portadoras do polimorfismo FecG^E do gene GDF9.

90

91 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

92 **2.1. Animais e grupos experimentais**

93 O experimento foi executado durante o mês de abril de 2014, referente à estação
94 de outono, nas instalações da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Campo Experimental
95 Pedro Arle, localizado no município de Frei Paulo, Sergipe, Brasil, a 10°55' (Sul) de

96 latitude e a 37°53' (Oeste) de longitude, com uma altitude de 272 metros e pluviosidade
97 média de 700 a 800mm por ano.

98 Foram utilizadas 21 ovelhas nulíparas da raça Santa Inês previamente genotipadas
99 para identificação do polimorfismo FecG^E do gene GDF-9, por meio do método PCR-
100 RFLP (SILVA et al., 2010). Todas as ovelhas apresentavam ciclos regulares até o início
101 do experimento e estavam com condição de escore corporal entre 3,0 e 3,5 (0 a 5),
102 conforme descrito por Russel et al. (1969), peso médio de 50,0 ± 5,0 Kg e idade entre
103 24 a 48 meses. As ovelhas permaneceram em regime de campo, em capim grama
104 estrela africana (*Cynodon Nlemfuensis* Vanderyst), água a vontade e suplementadas
105 com silagem de milho.

106 Os animais foram divididos em três grupos com sete ovelhas cada de acordo com
107 o seu genótipo relacionado ao FecG^E como segue: WW - selvagem não mutante; EW -
108 heterozigoto e; EE – homozigoto.

109 **2.2. Procedimentos**

110 O experimento decorreu em um período interovulatório do ciclo estral
111 subsequente ao manipulado, a fim de uniformizar e sincronizar os ciclos estrais das
112 ovelhas, porém evitando interferência dos hormônios exógenos na fisiologia durante o
113 período em que foram feitas as avaliações ovarianas.

114 **2.2.1. Manipulação prévia do ciclo estral e acompanhamento da dinâmica** 115 **folicular**

116 Todos os animais foram submetidos a um protocolo de manipulação do ciclo
117 estral (adaptado de LIMA et al., 2005). No dia zero (D0) foram inseridas esponjas
118 vaginais impregnadas com 60 mg de Acetato de Medroxiprogesterona - MAP
119 (Progespon® - SINTEX – Buenos Aires – Argentina) e aplicação por via intramuscular
120 (im), de 125 µg do análogo da prostaglandina F2 α (PGF2α) Cloprostenol (Prolise®-
121 Tecnopec - ARSA S.R.L. – Buenos Aires – Argentina). No dia nove (D9) as esponjas
122 foram removidas sendo as ovelhas submetidas a um manejo de observação do estro.

123 Para a detecção do estro foram utilizados seis rufiões vasectomizados,
124 previamente testados quanto à libido. Os rufiões foram colocados em contato com as
125 fêmeas durante um período de 30 minutos duas vezes ao dia em intervalos de 12 horas
126 (06:00 e 18:00h).

127 A dinâmica folicular foi avaliada em todos os animais de cada grupo experimental
128 por meio de um equipamento de ultrassonografia (MINDRAY DP2200Vet, Mindray
129 Medical International Limited, Nanshan, China) equipado com um transdutor eletrônico
130 endo-retal linear (75L50EAV), sendo a frequência utilizada de 7,5 MHz. As avaliações
131 abrangeram um período interovulatório subsequente àquele expresso após a indução
132 hormonal, sendo iniciadas a partir do momento da primeira aceitação de monta.

133 Durante os períodos de metaestro, diestro e proestro, as ultrassonografias foram
134 realizadas uma vez ao dia (BABY e BARTLEWSKI, 2011). A partir da aceitação da
135 monta até a observação do momento ovulatório, os exames foram intervalados a cada 12
136 horas às 06:00 e às 18:00 h (TOOSI et al., 2010). Esse intervalo permite satisfatória
137 detecção do momento ovulatório em detrimento da alta dispersão desse evento em
138 ovinos (ROMANO et al. 2001; BICUDO e SOUSA, 2003). Foi considerado como
139 momento ovulatório, a média entre o momento da última visualização do folículo pré-
140 ovulatório e aquele em que a sua presença não foi mais detectada.

141 O monitoramento da população folicular foi realizado da seguinte forma: em cada
142 exame foi identificada a posição, quantificado o número e mensurado o diâmetro (mm)
143 de todos os folículos ≥ 2 mm para cada onda sendo os dados registrados para posterior
144 análise do padrão de crescimento e/ou regressão. Os folículos foram classificados em
145 dois grupos de acordo com o tamanho: selecionados com diâmetros de 2 a 4 mm (≥ 2 e
146 < 4 mm) e os dominantes com diâmetros maiores que 5 mm (> 5 mm). A onda
147 ovulatória considerada foi a correspondente à emergência da última onda folicular que
148 culminou com a ovulação dos folículos dominantes presentes. Foram computados
149 também os seguintes parâmetros: período de desenvolvimento dos folículos antrais (d);
150 tempo de sobrevivência folicular (d); intervalo de tempo entre as emergências das ondas
151 (d); número de ondas foliculares (n); número de ovulações (n); diâmetro do folículo
152 ovulatório (mm); duração do período interovulatório (d); duração do estro (h); intervalo
153 de tempo do início do estro à ovulação (h).

154 **2.3. Análise estatística**

155 Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M.). As
156 características dos grupamentos genéticos ao longo do período interovulatório foram
157 submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados
158 paramétricos a exemplo de: período de desenvolvimento dos folículos antrais (d) e

159 diâmetro do folículo ovulatório (mm) foi utilizada a análise de variância de uma via
160 ANOVA com pós teste de Bonferroni; para os não paramétricos como: tempo de
161 sobrevivência folicular (d); intervalo de tempo entre as emergências das ondas (d);
162 número de ondas foliculares (n); número de ovulações (n); duração do período
163 interovulatório (d); duração do estro (h) e o intervalo de tempo do início do estro à
164 ovulação (h) foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's Multiple
165 Comparison. A identificação das variações entre as ondas foliculares dentro dos grupos
166 genéticos foi realizada por meio da análise de variância de duas vias ANOVA com pós
167 teste de Bonferroni. O programa estatístico utilizado foi o Graph Pad PRISM (GraphPad
168 Software, Inc., La Jolla, CA 92037, USA). Os valores foram considerados
169 estatisticamente significativos quando apresentaram nível de significância menor que
170 5%.

171 **3.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

172 Os resultados do monitoramento do desenvolvimento folicular ovariano e do
173 comportamento estral encontram-se expressos nas Tab 1 e Tab 2. No universo dos
174 animais estudados, o fator de variação número da emergência de três e quatro ondas
175 foliculares foi de 15 (71,42%) e 6 (28,58%), respectivamente. Quando esse fator foi
176 analisado dentro de cada grupo experimental, não verificou-se diferença na frequência
177 de três ondas de crescimento folicular entre os grupos WW, EW e EE. Como a
178 emergência de quatro ondas foliculares ocorreu em apenas uma repetição no
179 grupamento homozigoto, dessa forma, para os parâmetros: folículos selecionados com
180 diâmetros de 2 a 4 mm, folículos dominantes, período de desenvolvimento dos folículos
181 antrais, tempo de sobrevivência folicular e intervalo de tempo entre as emergências das
182 ondas, foram analisados apenas os animais que apresentaram três emergências
183 foliculares.

184

185 De modo geral, os resultados da dinâmica folicular como o desenvolvimento de
186 folículos selecionados e dominantes, período de desenvolvimento dos folículos antrais,
187 intervalo de tempo entre as emergências das ondas, número de ondas foliculares,
188 duração do período interovulatório e duração do estro não diferiram entre os genótipos.
189 Em ovelhas não portadoras de nenhum tipo de mutação genética esses parâmetros
190 também foram estudados ao longo do ciclo estral e verificados resultados semelhantes

191 aos encontrados nesse experimento (DUGGAVATHI et al., 2003; ALI et al., 2006;
192 SEEKALLU et al., 2010; TOOSI et al., 2010; BABY e BARTLEWSKI, 2011).

Tabela 1. Parâmetros (média \pm E.P.M.) resultantes do monitoramento do desenvolvimento folicular ovariano em um período interovulatório de 21 ovelhas Santa Inês nulíparas do tipo selvagem (WW, n=7); heterozigota (EW, n=7) e homozigota (EE, n=7) para o polimorfismo FecG^E do gene GDF-9.

PARÂMETROS	GENÓTIPO FecG ^E		
	WW	EW	EE
Percentual de ovelhas com 3 ondas foliculares (%)	57,14	71,42	85,71
Percentual de ovelhas com 4 ondas foliculares (%)	42,86	28,58	14,29
Número de folículos selecionados (≥ 2 e < 4 mm)	2,5 \pm 0,2	3,0 \pm 0,4	2,9 \pm 0,3
Número de folículos dominantes (≥ 5 mm)	1,1 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2
Período de desenvolvimento dos folículos antrais (d)	3,1 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3
Tempo de sobrevivência folicular (d)	6,0 \pm 0,4 ^a	4,6 \pm 0,4 ^b	2,9 \pm 0,5 ^b
Intervalo de tempo entre as emergências das ondas (d)	3,0 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	3,3 \pm 0,6
Número de ondas foliculares (n)	3,4 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	3,1 \pm 0,1
Número de ovulações (n)	1,7 \pm 0,2 ^a	1,9 \pm 0,1 ^{ab}	2,4 \pm 0,2 ^b
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	5,8 \pm 0,2 ^b	5,2 \pm 0,1 ^a	5,1 \pm 0,2 ^a

^{a-c} Valores seguidos de letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha diferem entre si (P<0,05).

193 O número de folículos selecionados não variou entre as ovelhas dos três genótipos
 194 estudados quando foram consideradas todas as ondas do período interovulatório. A
 195 seleção folicular tendeu a ser maior nas ondas ovulatórias em relação às outras, nos três
 196 genótipos avaliados. Entretanto, na onda ovulatória as do tipo heterozigota selecionaram
 197 mais folículos (P<0,05) do que as selvagens e as homozigotas: 5,6 \pm 0,4 vs. 4,0 \pm 0,4 e
 198 3,7 \pm 0,4; respectivamente. Aumento da seleção folicular na fase periovulatória em
 199 ovelhas também foi relatado por Duggavathi et al. (2003) em animais não portadores de
 200 mutação.

201 As ovelhas homozigotas para o polimorfismo FecG^E na primeira onda folicular,
 202 tiveram menor quantidade de folículos dominantes (0,3 \pm 0,3; P<0,05) do que as
 203 selvagens (1,5 \pm 0,3; P<0,05) e as heterozigotas (1,6 \pm 0,2; P<0,05). Resultados
 204 distintos foram encontrados em ovelhas portadoras do FecB (gene Booroola) por Souza
 205 et al. (1997), que observaram maior número de folículos dominantes na primeira onda
 206 nas mutantes em relação às não mutantes. Independentemente do genótipo, foi
 207 observada uma baixa frequência ou não foi verificada a presença de folículos
 208 dominantes na segunda onda folicular (0,2 \pm 0,1). Esses dados foram similares aos

209 citados por Toosi et al. (2010) e Seekallu et al. (2010), quando trabalharam com ovelhas
210 não portadoras de mutação genética. Esses autores verificaram que o baixo crescimento
211 sinergiu com o menor período de desenvolvimento folicular nessas ondas. Não foi
212 verificada diferença no número de folículos dominantes na onda ovulatória entre os
213 grupos genéticos (WW= $2,8 \pm 0,3$; EW= $3,2 \pm 0,2$; EE= $2,5 \pm 0,2$; $P < 0,05$). O maior
214 número de ovulações, entretanto foi nas ovelhas homozigotas em relação às do tipo
215 selvagem sendo as heterozigotas apresentando resposta intermediária, porém não
216 diferente dos demais grupos.

217 Pode-se inferir que ocorre maior incidência de atresia folicular nas ovelhas do tipo
218 selvagem e heterozigotas em relação às homozigotas. As ovelhas homozigotas
219 compensaram o fato de possuírem menor quantidade de folículos selecionados e
220 dominantes, apresentando menores índices de regressão ou atresia folicular. Nas ovelhas
221 heterozigotas e selvagens o nível de atresia foi maior e acabou revertendo a efetividade
222 quanto à capacidade ovulatória das ovelhas em benefício das homozigotas para FecG^E.

223 Animais portadores de várias mutações relacionadas à prolificidade possuem
224 maiores concentrações de fatores de crescimento (MOORE et al., 2004), que tanto
225 podem atuar no aumento do pool de folículos ativados e recrutados, como na redução de
226 regressão folicular por estimular a mitose das células da granulosa murais e por inibir a
227 sua luteinização (McNATTY et al., 2005; McNATTY et al. 2006; SCARAMUZZI et
228 al., 2011). As divergências encontradas entre os resultados obtidos neste trabalho e
229 aqueles citados na literatura a partir de estudos com outras mutações, podem estar
230 justamente nas diferenças entre os mecanismos pelos quais estes diferentes fatores
231 atuam promovendo a maior taxa de ovulação. A maior resistência dos folículos ao
232 processo de regressão ou atresia parece ser mais determinante para o aumento na taxa de
233 ovulação em animais portadores do FecG^E do que a proliferação e crescimento folicular.

234 Resultado superior no número de ovulações também foi verificado por Gonzalez-
235 Búlnes et al. (2004) em ovelhas portadoras de mutação Booroola. Souza et al. (1997) e
236 Gonzalez-Búlnes et al. (2004) relataram que, em fêmeas portadoras do polimorfismo
237 Booroola, a maior capacidade de ovulação pode ocorrer em virtude do maior
238 recrutamento de folículos primordiais e/ou a maior resistência à atresia, em função
239 dessa mutação provavelmente estar relacionada com a diferenciação precoce das células
240 da granulosa e aquisição de receptores de hormônio luteinizante (LH). Pode ser que

241 folículos de ovelhas FecG^E também tenham maior resistência ao processo de atresia e os
 242 motivos podem ser os mesmos merecendo investigações futuras. Fêmeas consideradas
 243 prolíficas possivelmente apresentam folículos com maior qualidade e funcionalidade,
 244 pois teriam um aumento da responsividade à secreção de gonadotrofinas
 245 (DRIANCOURT, 2001; LASSOUED et al., 2013).

246 O tempo de sobrevivência folicular foi maior nas ovelhas do tipo selvagem
 247 durante o período interovulatório (P<0,05). Entretanto, as ovelhas heterozigotas na onda
 248 ovulatória apresentaram valor intermediário (3,9 ± 0,4 dias, P<0,05) em relação aos
 249 outros dois grupos que diferiram entre si (WW - 7,0 ± 0,4 dias; EE - 1,0 ± 0,5 dias;
 250 P<0,05). A diferença encontrada no tempo de sobrevivência folicular entre os genótipos
 251 estudados ao longo das ondas foliculares, pode ser importante para identificação do
 252 melhor horário para se realizar punção folicular em doadoras de ovócitos e em
 253 protocolos hormonais onde são utilizados fatores exógenos para indução de ovulação,
 254 por exemplo.

255

256 Tabela 2. Parâmetros (média ± E.P.M.) resultantes do comportamento estral em um período interovulatório de
 257 21 ovelhas Santa Inês nulíparas do tipo selvagem (WW, n=7); heterozigota (EW, n=7) e homozigota (EE, n=7) para o
 258 polimorfismo FecG^E do gene GDF-9.

PARÂMETROS	GENÓTIPO FecGE		
	WW	EW	EE
Duração do período interovulatório (d)	17,7 ± 0,4	17,6 ± 0,4	17,3 ± 0,3
Duração do estro (h)	34,3 ± 3,1	39,4 ± 4,3	39,4 ± 2,2
Intervalo de tempo do início do estro à ovulação (h)	21,3 ± 2,3	28,0 ± 4,1	26,3 ± 2,6

259 (P<0,05)

260

261 Apesar de não significativo, o intervalo de tempo entre o início do estro e o
 262 momento da ovulação tendeu a ser menor nas ovelhas do tipo selvagem em relação às
 263 homozigotas e heterozigotas. Foi verificada alta variação individual desse parâmetro
 264 entre as ovelhas nos diferentes grupos genéticos (WW - 17:15 a 30:30 horas; EW -
 265 17:20 a 41:54 horas e; EE – 18:08 a 31:35 horas), fato esse comum em ovinos
 266 (ROMANO et al. 2001; BICUDO e SOUSA, 2003).

267 Em trabalhos de reprodução assistida a identificação do intervalo entre o início do
 268 estro e a ovulação é imprescindível para a orientação do melhor momento em que deve
 269 ocorrer a deposição do sêmen no útero. O controle do início do estro ainda continua

270 sendo uma prática altamente recomendada nesse tipo de trabalho em ovinos. Apesar de
271 não terem sido detectadas diferenças significativas entre os genótipos, os resultados
272 deste experimento indicam que, em programas envolvendo ovelhas portadoras do
273 FecG^E, a aplicação do sêmen pode ser mais tardia em relação ao momento das do tipo
274 selvagem.

275 4. CONCLUSÃO

276 As ovelhas nulíparas Santa Inês portadoras do polimorfismo FecG^E apresentam
277 menores tempo de sobrevivência folicular e diâmetro do folículo ovulatório em relação
278 às não mutantes, sendo que o grupo genético homozigoto possui um maior número de
279 ovulações.

280 5. REFERÊNCIAS

281 ALI, A.; DERAR, R.; H. HUSSEIN. Seasonal variation of the ovarian follicular
282 dynamics and luteal functions of sheep in the subtropics. **Theriogenology**, v. 66, 463-
283 469, 2006.

284 AZEVEDO, H.C.; OLIVEIRA, A.A.; MUNIZ, E.N.; PAIVA, S.R.; FRANCO,
285 M.M.; MELO, E.O. Embrapa Tabuleiros Costeiros produz rebanho de ovelhas Santa
286 Inês com maior prolificidade. Publicado em 22/12/2010. Disponível
287 em:<<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?Idpagina=artigos&artigo=6342&showaqu>
288 [isicao=true](http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?Idpagina=artigos&artigo=6342&showaqu)> Acesso em : 07/04/2014.

289 BABY, T.E. ; BARTLEWSKI, P.M. Circulating concentrations of ovarian steroids
290 and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle
291 emergence per estrous cycle. **Reprod. Biology**, v.11, n.1, p.19-36, 2011.

292 BICUDO, S.D., SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e ecg
293 em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk.
294 In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto
295 Seguro - BA. **Anais...** Belo Horizonte - MG: CBRA, 2003.

296 CASTRO, E.A.; LOPEZ, I.M.R.; LIMA, A.; FRANCO, M.M; PAIVA, S.R.;
297 SOUZA, C.J.H.; RUMPF, R. ; MELO, E.O. Characterization of a new SNP in the
298 growth and differentiation factor 9 (GDF-9) gene, specific for the brazilian Santa Inês
299 sheep. In: VIII WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK
300 PRODUCTION, Belo Horizonte, p. 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, 2006.

301 DUGGAVATHI, R. BARTLEWSKI P.M.; BARRETT, D.M.W.; RAWLINGS,
302 N.C. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers
303 of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular
304 waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 60, p.495-510, 2003.

305 DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**,
306 v. 35, p.55-79, 1991.

307 DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm
308 animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p.1211-
309 39, 2001.

310 GONZÁLEZ-BULNES, A.; SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K. ; BAIRD, D.
311 Effect of Ageing on Hormone Secretion and Follicular Dynamics in Sheep with and
312 without the Booroola Gene. **Endocrinology**, v. 145, n.6, p. 2858-2864, 2004.

313 KUMAR, S.; MISHRA, A.K.; KOLTE, A.P.; ARORA, A.L.; SINGH, D.;
314 SINGH, V.K. Effects of the Booroola (*FecB*) genotypes on growth performance, ewe's
315 productivity efficiency and litter size in Garole×Malpura sheep. **A. Reprod. Sci.**, v.,
316 105, p. 319-331, 2008.

317 LASSOUED, N.; REKIK, M.; GONZALEZ-BULNES, A.; BEN SALEM, I.;
318 TOUNSI, A. Prolific strains of Barbarine sheep are characterized by increased ovulation
319 rate due to extended period of ovulatory follicle recruitment and co-dominance effects.
320 **Small Rum. Res.**, v. 114, p. 134-139, 2013.

321 LIMA, I. M. T.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A. Influência do peso
322 ao parto e da estimulação hormonal sobre a taxa de fertilidade de ovelhas Santa Inês. In:
323 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 42., 2005.
324 Goiânia, **Anais...: SBZ**, 2005. p.

325 MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; READER, K.; LUN, S.;
326 HANRAHAN, J. P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L.
327 Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 234, p. 57-
328 66, 2005.

329 MCNATTY, K. P.; LAWRENCE, S.; GROOME, N. P.; MEERASAHIB, M. F.,
330 HUDSON, N. L.; WHITING, L.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L. Oocyte signalling
331 molecules and their effects on reproduction in ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18,
332 403-412, 2006.

333 MOORE, R. K.; G, F.; ERICKSON; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9
334 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Endocrinol. Metab.**, v.15, n.8,
335 p.356-361, 2004.

336 RUSSEL, A. J. F.; DONEY, J. M.; GUNN, R. G. Subjetive assessment of body
337 fat in live sheep. **J. of Agric. Sci.**, v. 72, p. 451-454, 1969.

338 ROMANO, J. E., FERNANDEZ ABELLA, D., VILLEGAS, N. A note on the
339 effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in
340 estrus synchronized ewes. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v.73, p. 193-8, 2001.

341 SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M.
342 A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; McNATTY,
343 K. P.; McNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIN~OLES, C.; WEBBL,
344 C. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants.
345 **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 23, p. 444-467, 2011.

346 SEEKALLU, S. V. ; TOOSI, B. M. ; DUGGAVATHI, R. ; BARRETT, D. M. W.
347 ; DAVIES, K. L.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics in sheep
348 revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves.
349 **Theriogenology**, v. 73, p. 670-680, 2010.

350 SILVA, B. D. M.; CASTRO, E. A.; SOUZA, C. J. H.; PAIVA, S. R.; PAIVA, S.
351 R.; SARTORI, R.; FRANCO, M. M.; AZEVEDO, H. C.; SILVA, T. A. S. N.; VIEIRA,
352 A.M. C.; NEVES, J. P.; MELO, E. O. A new polymorphism in the Growth and
353 Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and
354 prolificacy in homozygous sheep. *Anim. Genetics (Print)*, v. 42, p. 89-92, 2010.

355 SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R.; BAIRD, D. T. Secretion of
356 Inhibin A and Follicular Dynamics throughout the Estrous Cycle in the Sheep with and
357 without the Booroola Gene (*FecB*). **Endocrinology** .v. 138, n., 12, p. 5333-5340, 1997.

358 TOOSI, B. M.; SEEKALLU, S.V.; BARRETT, D.M.W; DAVIES, K.L.;
359 DUGGAVATHI, R. ; BAGU, E.T. ; RAWLINGS, N.C. Characteristics of peaks in
360 serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave
361 dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.73, p.
362 1192-1201, 2010.

1. ANEXOS

Normas para submissão de Artigo Científico na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.
- O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.
- O número de Referências não deve exceder a 30.
- Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.
- Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas. Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome doproduto, substância, empresa e país.

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

- **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
- **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).
- **Figura.** Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.
- **Nota:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências. As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415. NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000/.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-relatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

z.artigo@abmvz.org.br.