

MORFOMETRIA DE OVÁRIOS DE FETOS BOVINOS: ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

BOVINE FETAL OVARIAN MORPHOMETRY: ISOLATION AND QUANTIFICATION OF
PREANTRAL FOLLICLES

DEIZE DE CÁSSIA ANTONINO^{1*}, GESIEL VITOR SILVA², RENATA DE FREITAS FERREIRA MOHALLEM³, MAYARA OLIVEIRA¹, CARINA DINIZ ROCHA³, MARCELA LAÍS ANTONINO⁴, MAYARA MAFRA SOARES¹, GUSTAVO GUERINO MACEDO⁵, KELE AMARAL ALVES⁶, JOSÉ OCTÁVIO JACOMINI⁵

1. Discente de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia; 2. Acadêmico do curso de graduação de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; 3. Discente de doutorado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia; 4. Acadêmica do curso de graduação de Medicina Veterinária da Universidade de Franca; 5. Professor Doutor, Disciplina de Reprodução Animal do curso Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; 6. Pós-doutoranda da Universidade Federal de Uberlândia.

* Av. Pará, 1720, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. CEP: 38405-320. deize.bio@gmail.com

Recebido em 24/02/2017. Aceito para publicação em 24/04/2017

RESUMO

Objetivou-se avaliar a morfometria dos ovários direitos (ODs) e esquerdos (OEs) dos fetos bovinos e determinar a taxa de população média de folículos pré-antrais (FOPAs) utilizando o isolamento mecânico e o método de histologia clássica. Foram processados 10 ovários de fetos bovinos com aproximadamente 7 meses de gestação. Para o isolamento mecânico, utilizou-se o aparelho Tissue Chopper e os folículos foram classificados de acordo com os diâmetros. Para o processo de histologia clássica, os ovários foram submetidos a cortes e os FOPAs foram classificados de acordo com a morfologia. Os dados foram analisados por meio de testes de Tukey e Pearson no programa SISVAR ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os ODs e OEs quanto ao comprimento, espessura, largura e peso. No isolamento mecânico encontrou-se uma população média de folículos pré-antrais de 20.320, sendo 32% primordial, 59% primário e 9% secundário. Na observação histológica foram contados em média 81.747 folículos, sendo 32% primordial, 67% primário e 1% secundário. Ao comparar as taxas de folículos do isolamento mecânico com da histologia clássica, foi observada maior população de folículos primordiais e primários no método histológico. Conclui-se que a morfometria dos ODs e OEs de fetos bovinos com 210 dias não apresenta correlação com a quantidade de FOPAs contados no isolamento mecânico e no método de histologia.

PALAVRAS-CHAVE: *Bos taurus*, desenvolvimento folicular, foliculo ovariano.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the morphometry of the right (RO) and left ovaries (LO) of bovine fetuses and to determine the mean population rate of preantral follicles (FOPAs) using mechanical isolation and classical histology method. Ten ovaries of bovine fetuses were processed at approximately 7 months of gestation. For mechanical

isolation, the Tissue Chopper was used and the follicles were classified according to the diameters. For the classical histology process, the ovaries were cut and the FOPAs were classified according to the morphology. Data were analyzed using Tukey and Pearson tests in the SISVAR program ($P < 0.05$). There was no significant difference between RO and LO in length, thickness, width and weight. Mechanical isolation found a mean population of preantral follicles of 20,320, being 32% primordial, 59% primary and 9% secondary. In the histological observation, 81,747 follicles were counted on average, being 32% primordial, 67% primary and 1% secondary. When comparing follicle rates of mechanical isolation with classical histology, a larger population of primordial and primary follicles was observed in the histological method. It was concluded that the morphometry of the RO and LO of bovine fetuses with 210 days does not correlate with the number of FOPAs counted in the mechanical isolation and in the histology method.

KEYWORDS: *Bos Taurus*, follicular development, ovarian follicle.

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente população mundial, há uma preocupação em aumentar a produção de alimentos sendo a pecuária bovina uma possível estratégia. Para suprir a grande demanda destes produtos é preciso selecionar as características genéticas relacionadas à produtividade do rebanho (YOKOO *et al.*, 2007). Assim, é fundamental o uso das biotécnicas da reprodução animal como ferramenta para auxiliar nos programas de melhoramento genético da espécie (RODRIGUES; DE ÁVILA RODRIGUES, 2009) tais como: a inseminação artificial (IA), a transferência de

embrião (TE), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Além disso, alguns autores apontam a espécie bovina como modelo experimental ideal para comparação da foliculogênese inicial e reserva de gametas inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs), devido às semelhanças entre o ciclo reprodutivo da vaca com o de outras espécies, entre elas a humana (BAERWALD *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014). Portanto, a pesquisa sobre a reserva folicular pré-antral bovina pode favorecer o avanço genético, a conservação da espécie e disponibilizar informações importantes a serem aplicadas na reprodução humana.

Nos mamíferos, o ovário mantém a sua fertilidade na forma de estoque de ovócitos imaturos inclusos em milhares de FOPAs que em sua grande maioria, irão se tornar atresícos durante o seu crescimento e maturação (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Por volta dos 90-130 dias de gestação, a reserva de folículos primordiais bovinos é formada podendo continuar seu desenvolvimento (WANDJI *et al.*, 1996) chegando até a formação de antro por volta de 240 dias de prenhez (RÚSSE, 1983). Entretanto, Santos *et al.* (2013) verificaram que a partir dos 210 dias, fetos bovinos tiveram redução de quatro vezes de cada tipo de folículos ovarianos (primordial, primário e secundário) em comparação aos meses anteriores e a formação de antro a partir de 150 dias de prenhez. Acredita-se que o restante dos folículos recrutados que não formaram o antro, sofreram atresia ou apoptose por mecanismos ainda desconhecidos (ARAÚJO *et al.*, 2014). A utilização de ovários de fetos é importante, pois, além de serem bons modelos de estudos para compreensão dos estádios de crescimento dos folículos, da foliculogênese inicial, dos eventos envolvidos na atresia e apoptose folicular, que podem influenciar nas atividades reprodutivas do animal adulto. Além do mais, pode-se também reduzir o intervalo de gerações (BETTERIDGE *et al.*, 1989; HULSHOF *et al.*, 1994) facilitando a seleção de características desejáveis.

Dentro de nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que avaliaram a morfometria e a taxa de população média de folículos pré-antrais nos ovários direito (ODs) e esquerdo (OEs) de fetos bovinos com 210 dias de gestação. Assim, objetivou-se avaliar a morfometria dos OD e OE de fetos bovinos com aproximadamente 210 dias de gestação comparando com a contagem de FOPAs observada no isolamento mecânico e no processamento histológico. Dentro de nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que avaliaram a morfometria e a taxa de população média de folículos pré-antrais nos ovários direito (ODs) e esquerdo (OEs) de fetos bovinos com 210 dias de gestação. Assim, objetivou-se avaliar a morfometria dos OD e OE de fetos bovinos com aproximadamente 210 dias de gestação comparando com a contagem de FOPAs observada no isolamento mecânico e no processamento histológico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizados 10 ovários de fetos bovinos, SRD, com aproximadamente 7 meses de gestação (\pm 210 dias), provenientes de abatedouros localizados no município de Uberlândia-MG. Para a definição da idade fetal foi empregado o método de Rexroad *et al.* (1974), que estima o comprimento desde a articulação atlanto-occipital até a inserção da cauda. Após a colheita, os ovários foram lavados com álcool 70% por 5 segundos e armazenados em diferentes tubos de centrifugação cônicos de 15 mL. O transporte das amostras ao laboratório teve duração máxima de 1 hora em temperatura média de 4°C (CHAVES *et al.*, 2008).

Morfometria e processamento dos ovários

No laboratório os ODs e OEs foram pesados em balança de precisão com sensibilidade de 0,01 g e tiveram o comprimento (mm), a espessura (mm) e a largura (mm) medidos com um paquímetro. Após as medições, os ovários foram cortados ao meio longitudinalmente com um bisturi, assim uma das metades foi usada no método de isolamento mecânico e a outra submetida à histologia clássica.

Isolamento mecânico

Para o isolamento mecânico, utilizou-se o aparelho Tissue Chopper (McIlwain®, Ted Pella Inc.) calibrado para a espessura do corte em 75 μ m. Foram realizados 4 tipos de cortes nos ovários, sendo um no sentido longitudinal, um transversal e dois na diagonal (SANTOS *et al.*, 2013). Os fragmentos obtidos foram diluídos em 20 mL de solução PBS (tampão fosfato-salina), dissociados mecanicamente por repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se pipetas de Pasteur com diâmetro de entrada de 1600 μ m (40 movimentos) e 600 μ m (40 movimentos). A suspensão obtida foi filtrada em malhas de náilon de 500 μ m e 100 μ m de diâmetro, com a finalidade de separar os FOPAs dos fragmentos de tecido ovariano (AMORIM *et al.*, 2000).

Foram feitas 4 sub-amostras de 100 μ L (2 para cada ovário) em placas de Petri que foram levadas ao microscópio de fluorescência (Laser Scanning Microscope® - LSM 510 Meta) acoplado com microscópio invertido (Axiovert® 200 M) com aumento de 200x para a retirada de fotografias e posterior contagem e classificação usando as medidas obtidas pelo programa Zeiss LSM Image Browser (versão 4,2,0,121).

Para estimar a quantidade de FOPAs em cada ovário, utilizou-se uma fórmula de acordo com Amorim *et al.* (2000):

$$\text{Total FOPA/ovário} = \frac{A1 + A2 \times VF}{2}$$

Onde:

A1 = número de FOPA da amostra 1;

A2 = número de FOPA da amostra 2;

VF = volume final.

Para a classificação dos folículos, foram utilizados os seguintes diâmetros: primordiais: < 40 µm; primários: 40-60 µm; e secundários: > 60 µm (HULSHOF *et al.*, 1994).

Histologia clássica

Para o processo de histologia clássica, as metades dos ovários foram acondicionadas em solução de formol 10% e armazenados em álcool 70% até serem inclusos em blocos de parafinas. Após a fixação, os blocos de parafina já com as metades dos ovários, foram submetidos a cortes com espessura de 5 µm, utilizando o micrótomo LEICA RM2125RT. Os cortes teciduais foram colocados em lâminas histológicas, desparafinados e corados com hematoxilina e eosina.

A quantificação e classificação dos folículos foram realizadas utilizando o Microscópio Diagtech XJD403 em aumento de 400x. Os seguintes parâmetros dos ovários direito e esquerdo de cada feto foram avaliados: o número de folículos por ovário (direito e esquerdo); classificação dos folículos de acordo com o estágio de desenvolvimento sendo o primordial: ovócito imaturo no centro do folículo, rodeado por uma camada de células da pré-granulosa em formato pavimentoso; primário: ovócito imaturo no centro do folículo rodeado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica; secundário: ovócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica e presença de células da teca (HULSHOF *et al.*, 1994).

Para estimar a quantidade de FOPAs em cada ovário na histologia, foi usada a fórmula modificada de (GOUGEON; CHAINY, 1987):

$$NT = \frac{No \times Cp}{So \times Do}$$

Onde:

NT = Número total calculado de um tipo de folículo;

No = Número de folículos contados;

Cp = Comprimento do ovário;

So = Número total de cortes observados;

Do = Diâmetro médio de cada tipo de folículo.

Estatística

Os valores da média e desvio padrão das medidas morfométricas ovarianas e foliculares foram calculados por meio do software SISVAR. Para analisar o comprimento (cm), espessura (mm), largura (mm) e peso (g) entre os ODs e OEs utilizou-se o teste paramétrico de Tukey. Para análise de variância com normalidade utilizou o teste de Anderson-Darling e o teste de Kruskal-Wallis quando não foi observada a distribuição normal ou homogeneidade de variâncias. O coeficiente de correlação de Pearson avaliou as variáveis: comprimento (mm), espessura (mm), largura (mm), peso (g) e contagem de folículos de ovários de fetos bovinos. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

As médias das características morfométricas analisadas foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os ODs e OEs. Os valores das médias das variáveis do ODs quanto ao comprimento, espessura, largura e peso foram: $13,84 \pm 1,05$, $7,46 \pm 0,53$, $7,32 \pm 0,78$ e $0,44 \pm 0,11$, respectivamente. Com relação ao OEs as médias observadas foram: comprimento: $13,56 \pm 2,02$, espessura: $7,98 \pm 0,98$, largura: $6,00 \pm 0,15$ e peso: $0,46 \pm 0,11$. A correlação entre as variáveis comprimento (mm), espessura (mm), largura (mm), peso (g) e contagem dos folículos apresentou relação significativa para peso/comprimento ($P = 0,01$, Tabela 1) e peso/espessura ($P = 0,01$), sendo as demais variáveis semelhantes ($P > 0,05$).

Tabela 1. Correlação entre as variáveis: comprimento (mm), espessura (mm), largura (mm), peso (g) e contagem de folículos de ovários de fetos bovinos, SRD, com aproximadamente 210 dias.

Variáveis	C (mm)	E (mm)	L (mm)	P (g)	CF
	P	P	P	P	P
C (mm)	1	0,15	0,80	0,01*	0,46
E (mm)		1	0,57	0,01**	0,09
L (mm)			1	0,53	0,12
P (g)				1	0,36
CF					1

Valores considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. C: comprimento; E: espessura; L: largura; P: peso; CF: contagem de folículos. *Correlação estatisticamente significativa entre peso e comprimento ($P < 0,05$); **Correlação estatisticamente significativa entre peso e espessura ($P < 0,05$).

No isolamento mecânico foi encontrada uma população média de folículos pré-antrais de 20.320, sendo 32% primordial, 59% primário e 9% secundário. Na observação histológica clássica foram contados em média 81.747 folículos, dentre eles 32% primordial, 67% primário e 1% secundário. Ao avaliar as variâncias dentro da mesma técnica, observaram-se

diferenças ($P < 0,05$, Tabela 2) no isolamento mecânico apenas na taxa de folículos primários e secundários. Entretanto, ao analisar a taxa de folículos no método de histologia, existem variâncias entre os três estágios de desenvolvimento. Ao comparar o isolamento mecânico com as taxas de folículos da histologia clássica, foi encontrada maior ($P < 0,05$) população de folículos primordiais e primários no método histológico.

Tabela 2. Análise de variância entre o isolamento e a histologia clássica e a quantidade de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento oriundos de ovários de fetos bovinos, SRD, com aproximadamente 210 dias.

	Primordial	Primário	Secundário
Mecânico	53.79 ² aAB	73.86 ² aB	14.02 ² aA
Histológico	112.20 ² bB	158.95 ² bC	25.58 ² aA

Variâncias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e variâncias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados das características morfométricas diferem daqueles encontrados por Dias Junior *et al.* (2016) ao analisarem a morfometria dos ODs e OEs de vacas mestiças zebuínas, os autores encontraram diferença significativa ($P = 0,02$) quanto a largura maior dos ODs. Monteiro *et al.* (2008) avaliaram as alterações morfológicas dos ovários de vacas e novilhas da raça Nelore e também relataram que os ODs possuíam peso, comprimento e largura maiores do que os OEs. Estes mesmos autores também observaram que os ODs de vacas eram maiores em comprimento e largura quando comparados aos ODs de novilhas, pois as vacas possuíam uma região cortical mais desenvolvida do que a medular indicando a maturidade das gônadas (MONTEIRO *et al.*, 2008). Dessa forma, acredita-se que a semelhança entre as características morfométricas entre os ODs e OEs dos fetos bovinos é devido ao desenvolvimento, podendo levar a alusão de que o desvio no crescimento ovariano ocorre após o nascimento. Além do mais, Santos *et al.* (2013) estudaram a caracterização da foliculogênese e o desenvolvimento de ovários de fetos bovinos zebuínos. Foi apurado que os ovários de fetos com 7 meses apresentaram peso médio de $0,148 \pm 0,11$, diferenciando dos resultados do presente trabalho. Assim, acredita-se que embora não haja nenhuma explicação clara para esse efeito, a utilização de diferentes raças de gados bem como a nutrição, bem-estar e a seleção genética das vacas prenhas podem interferir nos resultados. Corroborando com este estudo, Rodrigues *et al.* (1998) ao avaliarem o efeito do peso ovariano com o número de folículos primários e secundários de cabras adultas, observaram uma correlação negativa quanto ao peso e a quantidade de folículos ovarianos totais encontrados. Portanto, o peso ovariano pode estar relacionado com estroma ovariano, pois ovários mais pesados podem apresentar mais

conteúdo fibroso (NICOSIA *et al.*, 1975).

Carámbula *et al.* (1999) utilizaram as técnicas de isolamento mecânico e mecânico-digestão para encontrar uma relação entre a idade do feto com a quantidade e o estágio de desenvolvimento dos FOPAs. Para fetos com 210 dias e a partir do isolamento mecânico, foram encontrados 1538 ± 378 de folículos primordiais, 1712 ± 454 de primários e 510 ± 151 de secundários. As taxas de recuperação média dos folículos primordiais, primário e secundário foram 40%, 45% e 13%, respectivamente. Constataram também que a partir de 210 dias de gestação, a quantidade de folículos primordiais diminui nos ovários dos fetos, aumentando, consequentemente, os folículos primários e secundários. Tais resultados atestam os resultados do presente trabalho, pois, observou-se maior recuperação de folículos primários, seguidos dos primordiais e secundários em histologia clássica. Santos *et al.* (2013) analisando a população de folículos pré-antrais por meio da histologia clássica, apontaram que fetos bovinos com 7 meses possuíam $37,721 \pm 25,212$ de primordiais, $23,374 \pm 13,813$ de primários e $2,960 \pm 1,626$ de secundários. Assim como no presente estudo, os resultados de Carámbula *et al.* (1999) e Santos *et al.* (2013) foram distintos. As justificativas para tais diferenças podem ser devido às diferentes técnicas utilizadas para quantificar os folículos e novamente pela distinção entre as raças dos fetos estudados, nutrição, bem-estar e seleção genética das vacas prenhas.

Além disto, acredita-se que a diminuição do número de folículos primordiais ocorra devido ao recrutamento, crescimento, seleção e dominância de apenas um folículo (LIMA *et al.*, 2016), porém, ainda com ovócitos imaturos como foi constatado por Chohan & Hunter (2003; 2004) na avaliação cromatina de ovócitos de folículos antrais (3-5 mm) de fetos bovinos. Os folículos restantes sofrem atresia ou entram em apoptose. Ainda não estão elucidados quais são os mecanismos que levam a dominância de apenas um, assim como os processos de atresia e a apoptose dos restantes (OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016). Desta forma, a população de folículos no ovário é heterogênea (GONÇALVES *et al.*, 2008), até mesmo nos ovários de fetos (HULSHOF *et al.*, 1994). Constatou-se que os folículos em fetos de sete meses variam entre si em relação ao estágio de desenvolvimento como foi visto por Santos *et al.* (2013). Além do mais, a própria técnica de isolamento mecânico pode levar a perdas de folículos, o que é confirmado no trabalho de Carámbula *et al.* (1999) ao encontrar diferença entre os isolamentos mecânico (93,816) e o mecânico-enzimático (371,556). Portanto, a escolha da técnica de isolamento e quantificação dependerá do objetivo, visto que o isolamento mecânico tem taxa de recuperação menor comparada a histologia clássica. Entretanto, o isolamento mecânico possibilita utilizar os folículos tanto para uma quantificação mais rápida não sendo necessário o preparo de lâminas histológicas, como também, para o

cultivo *in vitro*.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a morfometria dos ODs e OEs de fetos bovinos, SRD, com 210 dias não apresenta correlação com a quantidade de FOPAs contados no isolamento mecânico e no método de histologia.

6. FINANCIAMENTO

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

7. REFERÊNCIAS

- [1] AMORIM, C. A. *et al.* Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology*, v. 53, n. 6, p. 1251–1262, 2000.
- [2] ARAÚJO, V. R. *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Reproductive biology and endocrinology*, v. 12, n. 78, 2014.
- [3] BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update*, v. 18, n. 1, p. 73–91, 2012.
- [4] BETTERIDGE, K. J. *et al.* Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 38, p. 87–98, 1989.
- [5] CARÁMBULA, S. F. *et al.* Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology*, v. 52, n. 4, p. 563–571, set. 1999.
- [6] CHAVES, R. N. *et al.* Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 5, p. 640, 2008.
- [7] CHOCHAN, K. R.; HUNTER, A. G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*, v. 76, n. 1–2, p. 43–51, 2003.
- [8] CHOCHAN, K. R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, v. 61, n. 2–3, p. 373–380, 2004.
- [9] DIAS JUNIOR, P. L. *et al.* Características morfométricas de ovários de vacas mestiças de descarte coletados em abatedouro. *Veterinária Notícias*, v. 22, n. 1, 2016.
- [10] FIGUEIREDO, J. *et al.* Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.
- [11] GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO J. R.; FREITAS V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.
- [12] GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of reproduction and fertility*, v. 81, n. 2, p. 433–442, 1987.
- [13] HULSHOF, S. C. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary quarterly*, v. 16, n. 2, p. 78–80, 1994.
- [14] LIMA, L. F. *et al.* Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprodução & Climatério*, v. 31, n. 2, p. 93–104, 2016.
- [15] MONTEIRO, C. M. R. *et al.* Estudo morfológico comparativo dos ovários de vacas e novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*). *Ars Veterinaria*, v. 24, n. 2, p. 122–126, 2008.
- [16] NICOSIA, S. V.; EVANGELISTA, I.; BATA, S. K. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biology of reproduction*, v. 13, n. 4, p. 423–47, 1975.
- [17] OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, R. M.; MINGOTI, G. Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 35, p. 418–432, 2011.
- [18] REXROAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crown-Rump Length of Fetuses in Purebred Holstein-Friesian Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 57, n. 3, p. 346–347, 1974.
- [19] RODRIGUES, J. L.; DE ÁVILA RODRIGUES, B. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. *Ceres*, v. 56, n. 4, 2009.
- [20] RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica*, v. 24, p. 77–92, 1983.
- [21] SANTOS, S. S. D. *et al.* Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology*, v. 79, n. 2, p. 344–350, 2013.
- [22] SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 55, p. 123–135, 2016.
- [23] WANDJI, S. A. *et al.* Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 5, p. 942–948, 1996.
- [24] YOKOO, M. J. I. *et al.* Estimativas de parâmetros genéticos para altura do posterior, peso e circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 6, p. 1761–1768, 2007.