



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**Características genéticas e fisiológicas envolvidas na
caracterização das diferentes CFAs em novilhas das
raças Nelore e F1 Nelore x Angus**

JANAINA MENEGAZZO GHELLER

Campo Grande – MS
2023

JANAINA MENEGAZZO GHELLER

**CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E FISIOLÓGICAS
ENVOLVIDAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES
CFAs EM NOVILHAS DAS RAÇA NELORE E F1 NELORE
X ANGUS**

*Genetic and physiological characteristics involved in the characterization of
the different AFCs in heifers of the Nelore and F1 Nelore x Angus breeds*

JANAINA MENEGAZZO GHELLER

Orientadora: Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2023



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

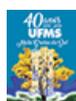


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Características genéticas e fisiológicas envolvidas na definição da população de folículos antrais em ovários de fêmeas da raça Nelore”, registrada com o nº 1.077/2019, sob a responsabilidade de **Gustavo Guerino Macedo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2019 a 01/06/2023
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Bos taurus</i>
Nº de animais	3000
Peso/Idade	350 kg / A partir de 10 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda São Judas Tadeu e Fazenda Arizona

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de setembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**, **Professor do Magisterio Superior**, em 30/09/2019, às 10:34, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CONSELHO DE ÉTICA - CE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

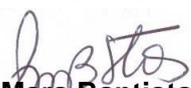
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito da substância apaziguadora bovina na eficiência reprodutiva de novilhas super precoce em sistema de confinamento”, protocolo nº 006/2021 sob a responsabilidade de Fabiana de Andrade Melo Sterza que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *chordata*, subfilo *vertebrata*, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (CONCEA). Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) em reunião realizada em 20/05/2021.

PROTOCOLO CEUA	Nº	006/2021
VIGÊNCIA DO PROJETO: 01/06/2021 até 01/06/2022		
ESPÉCIE/LINHAGEM: Bovino		
Nº DE ANIMAIS: 216		
PESO/IDADE: 260 kg.		
ORIGEM: Propriedade privada na zona rural, Anastácio - MS		
ACOMPANHAMENTO		
<input type="checkbox"/> ACOMPANHAMENTO PERMANENTE		
<input type="checkbox"/> RELATÓRIO SEMESTRAL		
<input type="checkbox"/> RELATÓRIO ANUAL		
<input checked="" type="checkbox"/> RELATÓRIO FINAL		
<input type="checkbox"/> OUTRO		

Aquidauana, 31 de maio de 2021.

CEUA/UEMS


Prof. Dra. Tânia Mara Baptista dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

À Deus e minha família,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim de mais uma etapa é impossível não ser grata. As batalhas da vida não são vencidas sozinhas, e durante essa caminhada muitas pessoas estiveram comigo e percorreram esse caminho fielmente ao meu lado. Por isso, devo essa conquista a elas.

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida. Por ter planejado tudo, não esquecendo de nenhum detalhe, pois Ele sabe exatamente de tudo que eu preciso. Por ser presença real em minha vida, por me amar de todo coração. Por ser meu amparo, refúgio, fortaleza e paz, em todos os momentos da minha vida. Pela minha família, amigos e por todas as oportunidades que a mim foram dadas.

Aos meus pais, Milton e Rosemari, pela vida, pela educação, pelo abraço fortalecedor em cada chegada e partida. Pelas orações, cuidado, preocupação e apoio. Por nunca medirem esforços para me verem feliz. Por lutarem tanto para ter uma vida digna e orgulhosa formando uma família maravilhosa e não nos deixando faltar nada, principalmente amor e carinho. Por todas as oportunidades que me deram, e para que tudo se tornasse possível muitas vezes renunciaram os seus sonhos para que os meus se realizassem. O que eu sou e tudo o que tenho devo a vocês! Obrigada por serem as melhores pessoas que eu poderia ter na vida. Eu amo muito vocês!

Ao meu irmão, amigo e colega de profissão, Luiz Fernando, pelo amor incondicional, pelo cuidado comigo desde sempre, pela infância marcada por boas lembranças. Pelo apoio, por nunca me negar ajuda. Por sempre torcer e acreditar em mim. Por despertar em mim o amor pela Medicina Veterinária. Tenho muito orgulho da pessoa e do profissional que você é. Obrigada por compartilhar a vida comigo. Eu amo você. Agradeço também à minha cunhada Karina, que sempre torceu por mim e me ajudou quando precisei. À vocês dois, meu agradecimento especial pela vida da nossa Luiza, que chegou para transformar nossa vida e deixa-la mais leve e feliz. Amo muito vocês três.

Ao meu noivo, namorado, melhor amigo, colega de profissão e parceiro para todas as horas, João. Obrigada pela compreensão, principalmente nos momentos finais do doutorado. Eu não teria chegado tão longe sem a sua paciência, amor e cuidado comigo. Obrigada por tudo que você faz e representa para mim. Amo você.

As minhas melhores amigas desde a infância, Bia e Carla, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, me alegrando e comemorando juntas as minhas conquistas, vou levar vocês para sempre comigo. A Ana que me acompanha fielmente desde o início da faculdade, pelo companheirismo e compreensão, com vocês tudo ficou mais fácil. Sinto muitas saudades.

A Mirela pela parceria desde o mestrado, que se tornou amiga, cunhada e comadre. Obrigada Mi por sempre estar disposta a me ajudar e por ter aberto a porta da sua família, que hoje também é minha família. Obrigada por me permitir viver com você e o Nikolas momentos únicos e especiais, e pelo presente maravilhoso que é a Liz nas nossas vidas. Amo vocês.

Aos colegas do SENAR MS, pela parceria diária no trabalho e por torcerem por mim para que esse dia chegasse. Vocês foram essenciais.

Peço desculpas aos que não estão presentes entre essas palavras, mas de forma geral, a todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, minha gratidão.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e todos os seus funcionários, que se dedicam para a formação de pessoas e profissionais qualificados.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, em especial aos mestres da Universidade e da Pós-Graduação por compartilharem conhecimentos e experiências, pois sem os seus ensinamentos não seríamos capazes de chegar tão longe.

A minha orientadora, Prof. Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza, essa que além de mestre tornou-se também uma grande amiga. Muito obrigada pelos ensinamentos, pelo trabalho, pela confiança, pelas inúmeras portas que você abriu para mim durante esse período. Obrigada por me acolher juntamente com a sua família, Renato, Gabi e Gigi, vocês formam uma família maravilhosa. Muito, muito obrigada por tudo.

Aos colegas do GENTRA e GERA pelo trabalho e ajudas mútuas. Com toda certeza, nada se constrói sozinho, muito menos um experimento, por isso agradeço de coração o esforço e paciência de todos os envolvidos nessa batalha, vocês foram essenciais.

Aos proprietários das fazendas Agropecuária Cedron e São Judas Tadeu e por cederem os animais para realização dos experimentos, pela troca de experiência e por tornarem-se grandes amigos, os quais eu jamais vou esquecer.

Agradeço também ao Dr. Marcos Chiaratti e toda sua equipe do laboratório LaGenBio da UFSCAR e ao professor Sérgio da UNB, pela parceria e prontidão em nos atender e realizar algumas de nossas análises, as quais foram cruciais para o desenvolvimento desse trabalho.

As instituições de fomento CNPq e FUNDECT pelo auxílio financeiro para realização dos projetos. Aos parceiros da UFMS e Repronutri pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

RESUMO

MENEGAZZO GHELLER, J. Características genéticas e fisiológicas envolvidas na caracterização das diferentes CFAs em novilhas das raças Nelore e F1 Nelore x Angus. 2023. DOUTORADO – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

Apesar do grande avanço no uso das biotecnologias da reprodução nos rebanhos bovinos do Brasil, é evidente que o sistema de produção precisa ser otimizado para melhorar a eficiência e rentabilidade. A fim de tornar o sistema mais rentável e sustentável, muitos estudos têm sido realizados. No que diz respeito ao manejo reprodutivo, destacam-se os que se dedicaram ao melhor entendimento da contagem de folículos antrais (CFA). A CFA tem sido associada a fertilidade em rebanhos de raças *Bos taurus* e *Bos indicus*, no entanto há divergência entre os resultados para as essas raças e diversos mecanismos ainda precisam ser compreendidos para que a seleção de animais, baseada nessas características seja eficiente e possa ser aplicada a todos os rebanhos. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as características genéticas e fisiológicas envolvidas na relação da CFA com a fertilidade de novilhas Nelore (*Bos indicus*) e F1 Nelore x Angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*), em programas de IATF. Para isso, essa tese foi desenvolvida em duas partes: com o perfil hormonal sérico e do fluido folicular (IGF-1, E2 e P4) com o desempenho reprodutivo de novilhas precoces da raça Nelore em programas de IATF (artigo 1) e a relação da CFA com desempenho a IATF, à qualidade oocitária e de carcaça; bem como a expressão gênica, por meio de RNA-seq, de oócitos de novilhas precoces e F1 Nelore x Angus (artigo 2) Para isso, foram utilizadas 70 novilhas Nelore e 140 novilhas F1 Nelore x Angus pertencentes a propriedades comerciais que trabalham com melhoramento genético e precocidade sexual das fêmeas bovinas, localizadas no estado de Mato Grosso do Sul. A identificação da CFA foi realizada pela contagem individual dos folículos visualizados por ultrassonografia transretal. A divisão dos grupos de CFA em ambos os artigos partiu do conhecimento da média da CFA e utilização de ± 1 desvio padrão da amostra, assim como já foi apontado em artigos que envolvem a CFA, uma vez que essa característica pode

ser alterada entre os rebanhos. No artigo 1 os grupos de baixa, média e alta CFA continham ≤ 14 , 15 a 30 e ≥ 31 folículos, respectivamente, enquanto no artigo 2 os intervalos foram ≤ 13 , 14 a 30 e ≥ 31 folículos. Em ambos os trabalhos não foram encontradas diferenças na taxa de concepção entre os grupos de CFA. No artigo 1, o IGF-I no D10 e no DG foi maior para o grupo alta CFA, e as concentrações de IGF-I não influenciaram a taxa de gestação. No artigo 2, não houve relação da CFA com os dados de ultrassonografia de carcaça (AOL, EG e EGP), tão pouco com a ultrassonografia de ovário e morfologia das estruturas ovarianas, exceto para o tamanho de ovário, o qual foi maior para o grupo alta CFA. Em relação a expressão gênica, 93,75% dos genes diferentemente expressos estavam positivamente regulados no grupo baixa CFA, os quais estão relacionados a causas de infertilidade. Dessa forma, concluímos que a CFA não esteve relacionada com a precocidade sexual das novilhas Nelore e Nelore X Angus, quando utilizamos a primeira prenhez a IATF como parâmetro.

Palavras-chave: Fertilidade; fluido folicular; população de folículos antrais; expressão gênica; oócitos;

ABSTRACT

MENEGAZZO GHELLER, J. Genetic and physiological characteristics involved in the characterization of the different AFCs in heifers of the Nelore and F1 Nelore x Angus breeds. 2023. DOCTORATE IN VETERINARY SCIENCES. Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

Despite the great advances in the use of reproductive biotechnology in cattle herds in Brazil, it is clear that the production system needs to be optimized to improve efficiency and profitability. To make the system more profitable and sustainable, many studies were carried out. Regarding reproductive management, those who have dedicated themselves to better understanding the antral follicle count (AFC) stand out. AFC has been associated with fertility in herds of *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds, however there is a divergence between the results for these breeds and several mechanisms still need to be understood so that the selection of animals, based on this characteristic, is efficient and can be applied to all herds. In this sense, the present work aims to evaluate the genetic and physiological characteristics involved in the relationship between AFC and the fertility of Nelore (*Bos indicus*) and F1 Nelore x Angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*) heifers, in FTAI programs. To this end, this thesis was developed in two parts to meet the objectives of evaluating the relationship between AFC: with the serum and follicular fluid hormonal profile (IGF-1, E₂, and P₄) with the reproductive performance of precocious Nelore heifers in FTAI programs (article 1) and the relationship between AFC and FTAI performance, oocyte and carcass quality; as well as gene expression, through RNA-seq, of oocytes from precocious and F1 Nelore x Angus heifers (article 2) For this, 70 Nelore heifers and 140 F1 Nelore x Angus heifers belonging to commercial properties that work with breeding were used genetics and sexual precocity of bovine females, located in the state of Mato Grosso do Sul. The identification of AFC was carried out by counting individual follicles visualized by transrectal ultrasound. The division of the AFC groups in both articles was based on knowledge of the mean AFC and the use of ± 1 standard deviation of the sample, as has already been pointed out in articles involving AFC, since this characteristic can be changed between herds Thus, in

article 1 the low, medium and high AFC groups contained ≤ 14 , 15 to 30 and ≥ 31 follicles, respectively, while in article 2 the ranges were ≤ 13 , 14 to 30 and ≥ 31 follicles. In both studies, no differences were found in conception rates between the AFC groups. In Article 1, IGF-I on D10 and DG was higher for the high AFC group, and IGF-I concentrations did not influence pregnancy rates. In article 2, there was no relationship between AFC and carcass ultrasound data (AOL, EG, and EGP), nor with ovarian ultrasound and morphology of ovarian structures, except for ovary size, which was larger for the ovary high AFC group. Regarding gene expression, 93.75% of the differently expressed genes were effectively regulated in the low AFC group, which is related to the causes of infertility. Therefore, we concluded that AFC was not related to the sexual precocity of Nelore and Nelore X Angus heifers, when we used the first pregnancy and FTAI as a parameter.

Keywords: Antral follicle population; fertility; follicular fluid; gene expression; oocytes;

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Classificações propostas para contagem de folículos antrais (CFA) em animais de origem <i>Bos taurus</i>	20
Tabela 2	Classificações propostas para contagem de folículos antrais (CFA) em animais de origem <i>Bos indicus</i>	21

Capítulo 2

Tabela 1	CFA, taxa de concepção e medidas ultrassonográficas de carcaça das novilhas F1 Nelore X Angus geral e nos grupos de CFA	56
Tabela 2	Avaliação ultrassonográfica dos ovários das fêmeas, no D0 e D11 do protocolo de IATF.	56
Tabela 3	Avaliação da morfologia dos pares de ovários obtidos após abate das fêmeas em estudo. Os valores apresentados representam a média por par de ovário por grupo de CFA.	57
Tabela 4	Genes anotados e diferencialmente expressos entre os grupos de baixa e alta CFA, sendo <i>up regulated</i> no grupo de baixa CFA	58
Tabela 5	Genes anotados e diferencialmente expressos, sendo <i>down regulated</i> no grupo de baixa CFA.	59
Tabela 6	Resultados da análise de enriquecimento funcional dos genes contendo termos Gene Ontology (GO) e KEGG relacionados a processos biológicos de genes expressos a partir de RNAseq de oócitos de novilhas Nelore x Angus.	60

Capítulo 3

Tabela 1	Taxa de concepção e reconcepção (%), e resultados da dosagem de hormônios IGF-1, E ₂ e P ₄ séricos e no fluido folicular de novilhas da raça Nelore com diferentes CFAs.	92
Tabela 2	. Análise de Correlação de Pearson entre a taxa de concepção e resultados da dosagem de hormônios IGF-1, E ₂ e P ₄ séricos e no fluido folicular de novilhas da raça Nelore.	93

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1 Análise de escala multidimensional (MDS plot), utilizada para reconhecer padrões entre as amostras. Podemos notar que em algumas posições houve agrupamento de amostras dos dois grupos, no entanto em outras as amostras estavam separadas, o que é o esperado. 58
- Figura 2 Volcano plot. O eixo y é referente ao $-\log_{10}$ dos valores de p não ajustados e o eixo x é referente ao \log_2 da diferença de expressão para cada um dos genes. Os pontos vermelhos são os genes regulados negativamente e os azuis regulados positivamente no grupo baixa CFA. 59

Capítulo 3

- Figura 1 Análise de regressão logística da probabilidade de prenhez em função da CFA para as fêmeas quando novilhas (A) e quando primíparas (B). 93
- Figura 2 Análise de regressão logística da probabilidade de prenhez em função da concentração sérica de IGF-1 no dia da inseminação artificial (AI) e diagnóstico de gestação (PD). 94

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH – Hormônio Anti-mulleriano
AMHR2a - *Anti-Mullerian hormone receptor type 2*
ANOVA – Análise de variância
AOL – Área de olho de lombo
BP – *Biological process*
Ca – Cálcio
CC – *Cellular component*
cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)
CFA – Contagem de folículos antrais
CL – Corpo lúteo
COC – Complexos oócitos cumulus
DAVID – *Database for annotation, visualization and integrated discovery*
DEGs - *Differentially expressed genes*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
E₂ - Estradiol
ECC – Escore de condição corporal
eCG – Gonadotrofina coriônica equina
EG – Espessura de gordura
EGP – Espessura de gordura da garupa
F1 – Primeira geração oriundo do cruzamento de duas raças
FD – Folículo dominantes
FF – Fluido folicular
FIV – Fertilização *in vitro*
FSH – Hormônio folículo estimulantes
GH – Hormônio do crescimento
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
GO – *Gene Ontology*
hCG – Gonadotrofina coriônica humana
HHG - Hipotálamo-hipófise-gônadas
i.m. - Intramuscular
IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LH – Hormônio luteinizante
Mg - Miligrama
Mg - Magnésio
MHZ - *Megahertz*
MiRNA - MicroRNAs
mL - Mililitro
mm – Milímetro
mRNA – RNA mensageiro
MS - *Spectrometry mass* (Espectometria de massa)
ng - Nanograma
P₄ - Progesterona
PGF2 α – Prostaglandina F2 α
PGR - *Progesterone Receptor*
RNA – Ácido ribonucleico
RNAseq – Sequenciamento de nova geração de RNA mensageiro
ROS - *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)
SAS – *Statistical analysis system*
SOP – Síndrome dos ovários policísticos
UI – Unidades internacionais

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	5
3.1.1 Caracterização e classificação dos folículos	6
3.1.1.1 Folículos pré-antrais	6
3.1.1.2 Folículos antrais	7
3.1.2 População folicular ovariana	8
3.2 PUBERDADE EM FÊMEAS BOVINAS	8
3.3 CONTROLE ENDÓCRINO DO CICLO ESTRAL	13
3.4 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (CFA)	16
3.4.1 CFA e a fertilidade	21
3.5 FLUIDO FOLICULAR E A FERTILIDADE	24
3.6 TRANSCRIPTOMA E A FERTILIDADE	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2	29
Artigo 1 - Novilhas Nelore x Angus com baixa CFA expressam mais genes ligados a infertilidade do que aquelas com alta CFA	44
CAPÍTULO 3	81
Artigo 2 – A fertilidade de novilhas e primíparas precoces da raça Nelore não tem relação com a CFA e concentrações séricas de IGF-1	81
CONCLUSÃO GERAL	112
IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL E TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	113

1 CAPÍTULO 1

3 1. INTRODUÇÃO GERAL

4 Para otimizar a produtividade de bovinos de corte tem-se buscado cada
5 vez mais identificar animais eficientes por meio de práticas de manejo eficazes
6 aliadas ao uso de tecnologia (VAZ E LOBATO, 2010). O uso de biotecnologias
7 reprodutivas nos rebanhos brasileiros tem aumentado consideravelmente. Nos
8 últimos 10 anos por exemplo, o número de fêmeas inseminadas aumentou cerca
9 de 11%, chegando em 2022 a 23,5% das fêmeas disponíveis para reprodução
10 sendo inseminadas, enquanto só a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em
11 2022 representou 97% das inseminações realizadas no Brasil (BARUSELLI,
12 2023). Hoje, os protocolos de IATF em bovinos estão bem estabelecidos em todo
13 o mundo alcançando taxas de prenhez entre 30 e 65% (MARTINEZ et al., 2002;
14 BARUSELLI, et al., 2012), com média de 50% no Brasil (BARUSELLI, 2023).
15 Apesar dos grandes avanços ainda existem barreiras a serem ultrapassadas,
16 como por exemplo, o aumento da média de prenhez à IATF e redução das perdas
17 gestacionais, especialmente das novilhas precoces, categoria alvo nos sistemas
18 de produção que buscam excelência.

19 Novilhas que manifestam puberdade e ciclicidade precocemente garantem
20 maior capacidade produtiva para o sistema, pois proporcionam menor idade ao
21 primeiro parto e apresentam maiores possibilidades de se tornarem gestantes no
22 início da estação de monta, gerando um produto de maior qualidade e que
23 nascerá e será desmamado em épocas adequadas (NASCIMENTO et al., 2003;
24 EMERICK et al., 2009). Sendo assim, infere-se que o desempenho reprodutivo da
25 novilha é dependente da precocidade em que a fêmea se torna púbere (DAY E
26 NOGUEIRA, 2013). Para tal, a utilização de planejamento reprodutivo,
27 melhoramento genético, estratégias nutricionais, manejo reprodutivo, protocolos
28 de indução hormonal como ferramentas de auxílio a antecipação da puberdade,
29 são medidas potencialmente efetivas para o progresso produtivo, reprodutivo e
30 lucrativo do sistema (SILVA et al., 2018; DICKINSON et al., 2019; GREGIANINI et
31 al., 2021). Nesse sentido, as biotécnicas utilizadas na reprodução tem ocupado
32 importante papel no cenário econômico da pecuária devido ao impacto que a

33 precocidade sexual representa no desempenho lucrativo da bovinocultura de
34 corte.

35 Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para encontrar ferramentas
36 que auxiliem na identificação de animais altamente eficientes o mais cedo
37 possível (BOLIGON et al., 2009; GREGIANINI et al. 2021). Há vários anos a CFA
38 tem sido investigada como potencial ferramenta para identificação de fêmeas
39 bovinas mais férteis, tendo em vista sua relação com a eficiência reprodutiva,
40 fertilidade e precocidade sexual das fêmeas bovinas (BURNS et al., 2005;
41 IRELAND et al., 2008; PONTES, et al., 2011; MOROTTI et al., 2015; 2017; 2018;
42 LIMA et al., 2020; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2021; GHELLER et al., 2023;
43 PFEIFER et al., 2023). Em fêmeas *Bos taurus* maiores taxas de concepção foram
44 demonstradas para animais com alta CFA (BURNS et al., 2005; IRELAND et al.,
45 2007; 2008; MOSSA et al., 2012; MARTINEZ et al., 2016; OLIVEIRA JÚNIOR et
46 al., 2021). Para animais *Bos indicus* os dados são controversos, sugerindo taxa
47 de concepção semelhante entre as fêmeas com diferentes CFA (BARUSELLI et
48 al., 2015) e melhores resultados em fêmeas com baixa CFA (SANTOS et al.,
49 2016; MOROTTI et al., 2018, GHELLER et al., 2023).

50 Apesar dos inúmeros avanços nos estudos da relação entre a CFA, o
51 desempenho reprodutivo e a eficiência das biotécnicas reprodutivas em bovinos,
52 muitos aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva das fêmeas permanecem
53 desconhecidos, principalmente às diferenças entre as subespécies (*Bos taurus*
54 *taurus* vs *Bos taurus indicus*). Além disso, as particularidades relacionadas à
55 população de folículos antrais ovarianos e sua influência na fertilidade dos
56 rebanhos, na precocidade sexual e influência sobre parâmetros produtivos não
57 está esclarecida (MOROTTI et al., 2015; SENEDA et al., 2019).

58 Estudos mais recentes investigando a relação da CFA com a qualidade de
59 oócitos e embriões produzidos *in vitro* quantificaram mRNA de genes presentes
60 em células da granulosa e do *cumulus*, e demonstraram que a variação na
61 expressão gênica não foi associada à competência de desenvolvimento *in vitro*
62 dos embriões (ROSA et al., 2018). Por outro lado, Lima et al. (2020)
63 demonstraram que oócitos e células do *cumulus* de novilhas Nelore com baixa
64 CFA exibiram padrões de expressão distintos dos genes ligados à comunicação
65 intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, adaptação e resposta ao
66 estresse celular e crescimento folicular. Ambos os trabalhos utilizaram para as

67 análises genes candidatos conhecidos, e a diferença encontrada entre eles pode
68 ser melhor esclarecida por análises de transcriptoma. Além disso, os trabalhos
69 citados utilizaram fêmeas Nelore, e não são encontrados na literatura dados que
70 abordem essas pesquisas em fêmeas cruzadas (Nelore x Angus), apesar de sua
71 crescente participação nos sistemas de produção brasileiros.

72 Por isso investigações mais aprofundadas são necessárias. Nesse estudo
73 propõe-se avaliações hormonais do ambiente folicular, pois acredita-se que a
74 análise do fluido folicular seja uma ferramenta com grande potencial para elucidar
75 os mecanismos envolvidos na fertilidade de fêmeas com diferentes CFAs e o
76 estudo do transcriptoma, o qual tem o potencial de identificar a expressão dos
77 genes que diferem entre os grupos sem a necessidade da escolha de genes
78 candidatos.

79

80

81 2. OBJETIVO

82

83 2.1 Objetivo geral

84

85 Avaliar o perfil de expressão gênica e características fisiológicas envolvidas na
86 relação da contagem de folículos antrais e a fertilidade de novilhas nelore (*Bos*
87 *indicus*) e F1 nelore x angus (*Bos indicus* x *Bos taurus*)

88

89 2.2 Objetivos específicos

90

91 - Avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas nelore e F1 Nelore x Angus com
92 diferentes CFAs expostas à IATF;

93 - Avaliar a morfologia dos oócitos oriundos de novilhas F1 Nelore x Angus com
94 diferentes CFAs;

95 - Avaliar o perfil hormonal do líquido folicular de novilhas Nelore com diferentes
96 CFAs;

97 - Avaliar o perfil hormonal no soro de novilhas Nelore com diferentes CFAs;

98 - Avaliar a relação entre a CFA e a precocidade sexual em novilhas Nelore e F1
99 Nelore x Angus;

100 - Avaliar o perfil de expressão gênica de oócitos de novilhas F1 Nelore x Angus
101 com diferentes CFAs;

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

Os processos de oogênese e foliculogênese, nas vacas e nas demais fêmeas de espécies domésticas, iniciam-se na fase fetal, e sendo assim, ao nascimento a fêmea possui uma reserva de oócitos e um número estabelecido de folículos primordiais ovarianos (LIMA-VERDE et al, 2011). A oogênese, em ruminantes, compreende o desenvolvimento e diferenciação germinativas primordiais e termina com a formação do oócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). A foliculogênese por sua vez, trata-se do processo fisiológico que tem início com a formação do folículo primordial e compreende os estágios até a formação do folículo pré-ovulatório (SAUMADE, 1981), terminando com a ovulação do folículo maduro ou atresia (FIGUEIREDO et al., 2002).

A oogênese inicia-se ainda na fase de embrião, quando as células germinativas primordiais, que estão na parede do saco vitelínico, migram para as gônadas em desenvolvimento, onde vão passar por intensa proliferação celular transformando-se em oogônias (SADEU et al., 2006). As oogônias sofrem sucessivas mitoses e parte delas continua se dividindo para manter a linhagem germinativa, e a outra parte inicia uma divisão meiótica que resulta na formação dos oócitos primários (HIRSHFIELD, 1991).

Durante a oogênese ocorrem duas paradas na divisão meiótica: a primeira delas acontece na prófase I (PI) no estágio de diplóteno, e o oócito permanece nessa fase até o estágio pré-ovulatório do folículo. A retomada da meiose é regulada pelas concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). As concentrações mínimas necessárias para esse estímulo acontecem quando o animal entra na fase de puberdade ou então, se repete a cada ciclo estral quando o folículo ativado alcança a fase pré-ovulatória (BUCCIONE et al., 1990). Na sequência, o oócito passa pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, momento no qual ocorre a liberação do primeiro corpúsculo polar (BETTERIDGE et al., 1989). A partir desse momento, o oócito do folículo pré-ovulatório, inicia a segunda fase da meiose e passa a ser secundário (BUCCIONE et al., 1990). No estágio de metáfase II ocorre a segunda interrupção da meiose, e nessa fase o oócito, já maduro, permanece até que aconteça a

147 ovulação. Nos casos em que acontece a fecundação, o oócito retoma a meiose II
148 e há a extrusão do segundo corpúsculo polar que marca o final da oogênese
149 (BETTERIDGE et al., 1989; BUCCIONE et al., 1990).

150

151 3.1.1 Caracterização e classificação dos folículos

152

153 O folículo é constituído por um oócito com células da granulosa e da teca, e
154 desempenha função endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides e
155 demais peptídeos) e exócrina ou gametogênica, proporcionando ao oócito um
156 ambiente favorável para o crescimento e maturação e por esse motivo é
157 conhecido como a unidade morfofuncional do ovário (VAN DEN HURK et al.,
158 1997; FIGUEIREDO et al., 2002).

159 Os folículos ovarianos localizam-se no córtex ovariano e encontram-se em
160 várias fases de desenvolvimento, sendo divididos em dois grandes grupos: os
161 folículos pré-antrais ou não cavitários, que compreendem os primordiais, primários
162 e secundários e, os folículos antrais ou cavitários, que compreendem os folículos
163 terciários e pré-ovulatórios (FIGUEIREDO et al., 2002).

164

165 3.1.1.1 Folículos pré-antrais

166

167 A população de folículos pré-antrais representa 90% da população total
168 (SAUMANDE, 1981) e apenas 0,1% desses folículos ovulam (CARROLL et al.,
169 1990; FIGUEIREDO et al., 1997; 2002). Os folículos pré-antrais são classificados
170 de acordo com a forma e número de camadas celulares presentes ao redor do
171 oócito imaturo (FIGUEIREDO et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2002).

172 Os folículos primordiais e primários podem ser diferenciados apenas pela
173 morfologia e não pelo diâmetro (HULSHOF et al., 1994). Os folículos primordiais
174 são formados por volta dos 130 dias de gestação e contêm um oócito circundado
175 por uma única camada com 4 a 8 células achatadas ou pavimentosas, conhecidas
176 como células da pré-granulosa. A grande maioria dos oócitos presentes no ovário
177 é armazenada nos folículos primordiais (BRITT, 1991). Após a sua formação, o
178 folículo primordial entra no período de quiescência e a proliferação celular
179 somente é retomada meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

180 e os mecanismos envolvidos no recrutamento desses folículos não estão
181 totalmente esclarecidos

182 A partir do momento que o folículo primórdial é recrutado, ele evolui para a
183 fase de folículo primário. Esse por sua vez contém um oócito rodeado por uma
184 única camada com 11 a 12 células da granulosa com aspecto cubóide, em maior
185 quantidade e mais volumosas (HULSHOF et al., 1994; VAN DER HURK et al.,
186 1997). Durante essa fase os oócitos primários continuam se desenvolvendo e as
187 células foliculares que o circundam também começam a se dividir, formando um
188 epitélio estratificado (FIGUEIREDO et al., 1997; LUCCHI et al., 2001). Nesse
189 momento há o surgimento da zona pelúcida, estrutura que circunda o oócito e se
190 mantém por todos o desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2002).

191 A partir desse momento inicia-se também a formação das células da teca e
192 há presença de pelo menos duas camadas de célula da granulosa e então está
193 formado o folículo secundário (FIGUEIREDO et al., 1997; VAN DER HURK et al.,
194 1997).

195

196 3.1.1.2 Folículos antrais

197

198 A última etapa da foliculogênese é marcada pelo surgimento de folículos
199 antrais que contém a presença do antro folicular, ou seja, uma área preenchida
200 por líquido formado entre as células da granulosa. Nessa categoria estão
201 presentes os folículos terciários e folículos pré-ovulatórios. Durante essa fase
202 acontece a formação do *cummulus oophorus*, da corona radiata, e há intensa
203 divisão das células tecais que circundam o oócito (FIGUEIREDO et al., 1997).

204 O surgimento dos primeiros folículos terciários é observado nos fetos por
205 volta dos 230 dias de gestação nas fêmeas bovinas (RÜSSE, 1983). Nessa fase
206 os folículos contêm um oócito circundado pela zona pelúcida, diversas camadas
207 de células da granulosa, antro folicular, membrana basal e duas camadas de
208 células da teca, a teca interna e externa (GORDON, 1994). Por meio de
209 mecanismos endócrinos, o folículo vai tornando-se maduro e é chamado de
210 folículo de *Graaf* ou pré-ovulatório, e é nessa fase que o oócito completa a
211 primeira divisão meiótica, estando pronto para a ovulação (FIGUEIREDO et al.,
212 1997).

213

214 3.1.2 População folicular ovariana

215

216 A população folicular ovariana é influenciada por diversos fatores tais como
217 a espécie, raça (CAHILL et al., 1979), linhagem genética (SMITH et al., 1994),
218 idade, níveis hormonais (ROY E TREACY, 1993) e o estado reprodutivo
219 (ERICKSON, 1966). Além desses fatores, acredita-se que o ambiente uterino no
220 qual o feto é formado e permanece durante o desenvolvimento também pode
221 influenciar o tamanho da reserva folicular ovariana, uma vez que o conjunto de
222 folículos primordiais é estabelecido nas fêmeas bovinas durante o segundo
223 trimestre de gestação (MOSSA et al., 2012). O número de folículos antrais é uma
224 característica altamente variável entre as fêmeas bovinas e suas raças (BURNS
225 et al., 2005; IRELAND et al., 2008; SANTOS et al., 2016), no entanto apresenta
226 alta repetibilidade individual (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2008; SILVA-
227 SANTOS et al., 2014; OLIVEIRA JUNIOR et al, 2015; MOROTTI et al., 2017).

228 Estima-se que bezerras tem ao nascimento cerca de 235.000 folículos pré-
229 antrais (BETTERIDGE, et al., 1989), entre 20 e 24 meses em torno de 76.851 e
230 109.673 e com idade entre 72 e 96 meses valores próximos a 39.438 e 89.577
231 folículos, para *Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente (SILVA-SANTOS et al.,
232 2011).

233

234 3.2 PUBERDADE EM FÊMEAS BOVINAS

235

236 A puberdade na fêmea é definida como o momento em que os animais
237 apresentam o primeiro cio e ovulação seguidos de uma fase lútea. No entanto,
238 embora sejam fenômenos dependentes, esse conceito não representa a
239 maturidade sexual (BYERLEY et al., 1987; SÁ FILHO et al., 2011). Uma fêmea
240 pode ter se apresentado púbere com a primeira ovulação, no entanto a
241 maturidade sexual pode ser atingida completamente após três ou quatro ciclos
242 estrais consecutivos. Dessa forma, maturidade sexual é definida como um
243 processo gradual que se inicia com a puberdade e a fertilidade é adquirida com os
244 ciclos estrais subsequentes (GOTTSCHALL, 2011).

245 A puberdade envolve um momento de transição entre um período de
246 inatividade ovariana (anestro pré-puberal) para um período no qual as ovulações
247 devem ocorrer de forma regular (MORAN et al., 1989). Para tal, o processo de

248 desencadeamento da puberdade e posterior maturidade sexual, é ocasionado por
249 meio de um complexo mecanismo neuro-endócrino, que é controlado por uma
250 série de eventos hormonais, resultando em inúmeras alterações fisiológicas e
251 morfológicas (SÁ FILHO et al., 2011).

252 Após o nascimento, vários mecanismos evitam a ativação do sistema
253 endócrino reprodutivo antes do tempo, permitindo a continuidade do crescimento
254 e desenvolvimento do animal até que ele alcance cerca de 65-70% do peso adulto
255 (PATTERSON et al., 1992; SEMMELMAN et al., 2001). Bezerras de 1 a 3 meses
256 de idade possuem o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) funcionalmente
257 maduro (BARNES et al., 1980; NAKADA et al., 2002), sendo capazes de
258 desenvolver uma cascata de eventos endócrinos que induzem ao estro.
259 Entretanto, a alta sensibilidade do hipotálamo ao estradiol leva à inibição da
260 atividade reprodutiva (DAY et al., 1987; SCHILLO 2003).

261 Anteriormente ao evento da puberdade das fêmeas acontece uma
262 diminuição progressiva da resposta hipotalâmica ao estradiol, a qual é ocasionada
263 pela redução do número de receptores para esse hormônio no hipotálamo e na
264 hipófise. Ao mesmo tempo, em consequência da secreção de GnRH, há o
265 aumento da estimulação hipofisária e da secreção de altas concentrações de LH
266 (DAY et al., 1987; NAKADA et al., 2000). Nesse momento, a pulsatilidade do LH
267 aumenta atuando nas gônadas e favorecendo o crescimento de folículos antrais,
268 bem como a síntese de estradiol. O estradiol, por sua vez, é o responsável por
269 induzir o comportamento estral e ocasionar a liberação de uma onda pré-
270 ovulatória de LH, que vai resultar na ovulação do folículo dominante (RAWLINGS
271 et al., 2003). Essa série de modificações são desencadeadas por sinais
272 originados internamente, mas que estão relacionados a idade, crescimento
273 corporal, peso, genética e outros fatores externos (EMERICK et al., 2009).

274 De forma geral, os mecanismos fisiológicos envolvidos no
275 desencadeamento da puberdade são intimamente relacionados com a
276 composição genética dos animais. Por exemplo, existem diferenças reprodutivas
277 entre zebuínos e taurinos que fazem com que os primeiros fossem durante muito
278 tempo considerados mais tardios (SARTORI et al., 2010). As diferenças entre
279 animais dessas raças são atribuídas principalmente as variações no ambiente de
280 onde elas foram originadas e exploradas, bem como ao processo de seleção ao
281 qual foram expostas. Nesse sentido, os zebuínos foram submetidos à menor

282 pressão de seleção para características relacionadas à precocidade e fertilidade
283 sexual, enquanto para taurinos a seleção foi mais intensa (CHENOWETH, 1994),
284 e assim então, durante muito tempo, as fêmeas zebuínas alcançaram a
285 puberdade com peso e idade mais elevados (CHENOWETH, 1994; EMERICK et
286 al., 2009).

287 Um dos principais fatores relacionados a puberdade ainda é a idade. As
288 relações entre a idade do início das ovulações e idade ao primeiro parto são
289 características utilizadas para determinar a precocidade sexual. A redução da
290 idade ao primeiro parto, em consequência da precocidade sexual dos animais,
291 parece ser um grande desafio para os animais, principalmente de origem zebuína
292 no Brasil. (BERGMANN, 1998) No entanto, a atuação dos programas de
293 melhoramento genético somada ao interesse dos produtores em produzirem
294 animais mais precoces sexualmente, trouxe uma nova realidade para os animais
295 *Bos indicus*. Atualmente, utilizando estratégias reprodutivas, as fêmeas Nelore
296 conseguem atingir a puberdade com idade entre 13 e 15 meses (SILVA et al.,
297 2015) e isso representa um grande avanço dentro dos sistemas de produção de
298 bovino. Uma medida para tornar essa busca mais eficiente é a utilização de
299 características indicadoras de precocidade sexual, que tenham variabilidade
300 genética adequada, que sejam de fácil mensuração, economicamente viáveis, e
301 que tenham correlação genética favorável com idade à puberdade e outras
302 características economicamente importantes (BERGMANN, 1998; GREGIANNI, et
303 al., 2021).

304 Além da idade, sabe-se que o início da puberdade e a manutenção da
305 função reprodutiva estão fisiologicamente ligados à nutrição e à condição corporal
306 (EBLING et al., 1990; KEISLER; LUCY, 1996), uma vez que a deficiência
307 nutricional em novilhas afeta negativamente a secreção de hormônios pelo
308 hipotálamo atrasando a primeira ovulação (AZEVEDO et al., 2006). Por outro
309 lado, a nutrição eficiente tem influência sobre os pulsos de LH, provavelmente,
310 pela modulação da liberação de GnRH, antecipando a manifestação da
311 puberdade (GASSER et al., 2006). Dessa forma, a puberdade pode ser
312 antecipada e índices reprodutivos podem ser melhorados se as fêmeas foram
313 submetidas, na fase de recria, à um manejo nutricional que permita maiores
314 ganhos em peso (SILVA et al., 2005). Nesse sentido, Alencar et al. (1987)
315 observaram que as novilhas Nelore que apresentaram maior peso aos 12 e 18

316 meses possuíam menor idade a puberdade (BERGFELD et al.,1994) que suas
317 contemporâneas com menor peso e menor ganho de peso com essa idade
318 (SHORT; BELOWS, 1997). Por outro lado, o excesso de peso também pode ser
319 prejudicial ao desempenho reprodutivo, já que a composição corpórea, assim
320 como a dieta, interfere no desenvolvimento embrionário inicial, comprometendo a
321 qualidade do embrião e a taxa de concepção, além de possibilitar que os animais
322 se tornem hiperinsulinêmicos (ADAMIAK et al., 2005).

323 O entendimento de como os estímulos nutricionais afetam o sistema
324 nervoso central e modulam a frequência da liberação dos pulsos de LH pela
325 hipófise anterior tem sido procurado nas últimas décadas. Flutuações no
326 metabolismo intermediário associadas a mudanças tanto na massa como na
327 gordura corporal podem modular a liberação dos pulsos de LH (SCHILLO et al.,
328 1992; HINEY et al., 1996). Dentre outros, alguns sinais metabólicos têm sido
329 excessivamente estudados, são eles: a leptina o fator de crescimento semelhante
330 à insulina do tipo 1 (IGF-I), a insulina e o hormônio do crescimento (GH)
331 (FOSTER; NAGATANI, 1999).

332 O IGF-I pode regular o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) por meio
333 de suas ações na hipófise através de seus efeitos sobre os hormônios
334 hipofisários. (HINEY et al., 1996). Relações entre IGF-I e função ovariana e entre
335 GH e IGF-I foram documentadas em ovelhas (CAMPBELL, 1999; THOMAS et al.,
336 2000) e foram considerados fatores de grande importância na precocidade sexual
337 desses animais. Foi relatada a presença de IGF-I e de seus receptores no ovário,
338 onde constituem parte do sistema de sinalização e regulação intra-ovariana.
339 Estudos *in vitro* demonstraram que o IGF-I aumentaria o estímulo das células da
340 granulosa e atuaria juntamente ao FSH no estímulo da secreção de progesterona
341 pelas células da granulosa cultivadas (ADASHI et al., 1985).

342 O aumento no IGF-I plasmático no momento de elevada atividade
343 hipotalâmica- hipofisária-gonadal, especificamente no dia do primeiro pró-estro,
344 sugere que o IGF-I contribuiu para o processo puberal (HINEY et al., 1996).
345 Elevados níveis de IGF-I foram encontrados na eminência média onde o GnRH é
346 liberado (HINEY et al., 1991), modulando tanto a expressão quanto a liberação do
347 GnRH (ANDERSON et al., 1999). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que o
348 IGF-I induziu a um aumento na liberação do LH estimulado pelo GnRH em
349 culturas de células hipofisárias (KANEMATSU et al.,1991; SOLDANI et al., 1995).

350 Condições metabólicas desfavoráveis em consequência de restrição
351 alimentar podem diminuir a concentração de insulina, IGF-I e a secreção de LH e
352 assim, contribuir para o atraso na puberdade (GLASS et al., 1976; RICHARDS et
353 al.,1991; AMSTALDEN et al., 2005). O fígado produz IGF-I em resposta ao
354 estímulo do GH, e em situações de restrição alimentar, foi observada diminuição
355 nas concentrações circulantes de IGF-I, mesmo com elevadas concentrações de
356 GH. Esta falha na resposta hepática é causada pela redução na concentração de
357 insulina, que leva a uma diminuição na concentração de IGF-I (THISSEN et al.,
358 1994). Após restabelecer a alimentação adequada, a produção de IGF-I aumenta
359 devido ao aumento na sensibilidade do receptor de GH em resposta a ação do
360 aumento da insulina (PAO et al., 1993), uma vez que IGF-I e insulina estão
361 fisiologicamente unidas e ambos aumentam de acordo com o aumento da
362 condição corporal e peso do animal, explicando a maior incidência de ciclos
363 estrais nesses animais. Por fim, quando os animais estão ganhando peso, uma
364 correlação positiva entre concentrações circulantes de leptina e IGF-I, e de leptina
365 e insulina foi encontrada. Assim, insulina, IGF-I e leptina estão positivamente
366 associados com peso corporal e ECC, e esses processos então intimamente
367 relacionados com o evento da puberdade, que a partir do seu início, em
368 condições normais, apresentará ciclos estrais regulares até que haja a gestação.

369 Sabendo que a puberdade, é considerada o marco inicial da vida
370 reprodutiva e produtiva de uma fêmea, novilhas que manifestam puberdade e
371 ciclicidade precocemente garantem maior capacidade produtiva para o sistema,
372 pois proporcionam menor idade ao primeiro parto e apresentam maiores
373 possibilidades de se tornarem gestantes no início da estação de monta, gerando
374 um produto de maior qualidade e que nascerá e será desmamado em épocas
375 adequadas (NASCIMENTO et al., 2003; EMERICK et al., 2009). Sendo assim,
376 infere-se que o desempenho reprodutivo da novilha é dependente da precocidade
377 em que a fêmea se torna púbere (DAY E NOGUEIRA, 2013). Para tal, a utilização
378 de planejamento reprodutivo, melhoramento genético, estratégias nutricionais,
379 manejo reprodutivo, protocolos de indução hormonal como ferramentas de auxílio
380 a antecipação da puberdade, são medidas potencialmente efetivas para o
381 progresso produtivo, reprodutivo e lucrativo do sistema (SILVA et al., 2018;
382 DICKINSON et al., 2019; GREGIANINI et al., 2021).

383

3.3 CONTROLE ENDÓCRINO DO CICLO ESTRAL

384
385

386 Os bovinos são considerados animais poliéstricos não sazonais, ou seja,
387 apresentam comportamento estral o ano inteiro (ROCHE, 1996). Um ciclo estral
388 da fêmea bovina tem duração média de 21 dias, e compreende duas fases
389 distintas: lútea ou progesterônica e folicular ou estrogênica (FORDE et al., 2011).
390 A fase lútea compreende o metaestro e diestro, ou seja, o período seguinte a
391 ovulação no qual há formação do corpo lúteo (CL). O CL permanece ativo por
392 aproximadamente 14 dias, até que sofra regressão, nos casos em que não haja
393 gestação. A fase folicular compreende o pró-estro e o estro, (duração aproximada
394 de três e 10 a 18 horas, respectivamente) e tem início após o desaparecimento do
395 CL (luteólise) e se estende até a próxima ovulação. É durante essa curta fase que
396 acontece a maturação final do folículo pré-ovulatório e ovulação, liberando o
397 oócito para possível fertilização (FORDE et al., 2011).

398 Nas fêmeas bovinas, é o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que controla
399 o ciclo estral e esse por sua vez se repete até que haja a gestação. As funções
400 ovarianas (recrutamento e desenvolvimento folicular, ovulação, luteinização e
401 luteólise) são reguladas por hormônios: hipotalâmico (Hormônio liberador de
402 gonadotrofinas (GnRH); hipofisários (Hormônio folículo estimulante – FSH e
403 Hormônio luteinizante – LH); ovarianos (Progesterona, Estradiol e Inibinas);
404 uterinos (Prostaglandina – F2 α), que funcionam por meio de um sistema de
405 *feedback* positivo e negativo para controlar o ciclo estral (ROCHE, 1996; CROWE,
406 2008; FORDE et al., 2011).

407 O hipotálamo é o responsável por secretar o GnRH que tem como papel,
408 por meio do sistema hipotalâmico hipofisário, estimular a hipófise promovendo a
409 liberação de gonadotrofinas (FORDE et al., 2011). As gonadotrofinas secretadas
410 e liberadas pela hipófise são FSH e LH. O FSH é armazenado em grânulos
411 secretores no citoplasma por períodos curtos, enquanto o LH é armazenado por
412 períodos mais longos (FARNWORTH, 1995). Tanto o FSH quanto o LH possuem
413 papel fundamental no desenvolvimento dos folículos, uma vez que o recrutamento
414 e o crescimento folicular estão relacionados com os mecanismos de *feedback* do
415 eixo controlador. Paralelamente, como é essencial a ação do estradiol e inibinas
416 produzidas pelas estruturas ovarianas, especialmente no período final do

417 desenvolvimento dos folículos. O controle desses fenômenos ocorre em grande
418 parte pela progesterona produzida pelo CL (REECE, 1996; WEBB et al., 2004).

419 O ciclo acontece em um padrão de ondas de crescimento folicular,
420 compreendendo as fases de emergência folicular, fase de desvio ou divergência e
421 a fase de dominância, a qual vai resultar na ovulação (GINTHER et al., 2003). Os
422 mecanismos desencadeadores do recrutamento e responsáveis pelo número de
423 folículos primordiais que iniciam o crescimento ainda não estão completamente
424 elucidados, no entanto há estudos com utilização de auto-enxertos de ovário onde
425 foi possível observar que o período para um folículo primordial atingir o estágio
426 pré-ovulatório leva cerca de 90 dias (CAMPBELL et al., 2000).

427 A emergência de uma onda folicular é caracterizada pelo recrutamento de
428 um novo grupo de folículos que acontece no dia da ovulação, conhecido como dia
429 0 (D0) e essa fase coincide com o aumento transitório de FSH, o qual é
430 responsável por recrutar e estimular o crescimento de folículos, em torno de $33,4$
431 $\pm 3,2$ e $25,4 \pm 2,5$ folículos por onda para *Bos indicus* e *Bos taurus*,
432 respectivamente (CARVALHO et al, 2008).

433 À medida que os folículos vão crescendo a alta concentração de FSH induz
434 o aumento na atividade da enzima aromatase, presente nas células da granulosa,
435 que é responsável por converter andrógeno em estrógeno (HILLIER, 1994).
436 Dessa forma, os folículos aumentam de tamanho e acumulam líquido folicular,
437 promovendo aumento significativo das concentrações plasmáticas de estrógeno
438 produzido pelo próprio folículo. Nesse momento, o estrógeno age, por um
439 mecanismo de *feedback* positivo, estimulando o hipotálamo a continuar liberando
440 GnRH para que mais gonadotrofinas sejam liberadas (GINTHER et al., 1996). A
441 ação do estrógeno durante a fase folicular promove a alteração do
442 comportamento das fêmeas como inquietação, micção e mugidos frequentes,
443 comportamento de monta e liberação de muco cristalino, que vai facilitar a cópula
444 e o transporte dos espermatozoides através do sistema genital (REECE, 1996;
445 FIGUEIREDO et al., 1997; FIGUEIREDO E FREITAS et al., 2002).

446 Após a emergência dos folículos, que dura cerca de três dias (GINTHER et
447 al.,1996; SARTORELLI et al., 2005), ocorre a fase de desvio folicular na qual
448 apenas um dos folículos recrutados continua a se desenvolver, sendo então
449 chamado de folículo dominante. A divergência é estabelecida quando o maior
450 folículo chega a um diâmetro de 8,5 mm em animais de raças taurinas (*Bos*

451 *taurus*; GINTHER et al., 1999) e 6,1 mm para fêmeas zebuínas (*Bos indicus*;
452 SARTORELLI et al., 2005). O folículo dominante passa então a secretar maiores
453 concentrações de estrógeno e de inibina no fluido folicular, responsáveis pela
454 queda da concentração de FSH próxima a níveis basais (SUNDERLAND et al.,
455 1994; MIHM E BLEACH 2003). O folículo dominante torna-se cada vez mais
456 sensível ao LH e continua o crescimento mesmo com a decrescente concentração
457 de FSH. Independente da fase do ciclo estral, a alternância entre a dependência
458 de FSH para a dependência de LH acontece pela presença de receptores de LH
459 localizados nas células da teca e da granulosa dos folículos em diferentes
460 estágios de desenvolvimento. Assim, à medida que o folículo se desenvolve os
461 receptores para LH aumentam e ele se torna dominante (CROWE, 2008;
462 NOGUEIRA et al., 2010; FORDE et al., 2011).

463 O destino do folículo dominante depende da frequência e amplitude de
464 pulso do LH (CROWE, 2008). Durante a fase lútea inicial, o padrão de
465 pulsatilidade do LH é de amplitude menor e de frequência maior com cerca de 20
466 a 30 pulsos/24 horas, enquanto no meio da fase lútea os pulsos de LH passam a
467 ser de amplitude maior e de frequência menor, em torno de seis a oito pulsos/24
468 horas. Esse padrão de pulsatilidade ainda é insuficiente para promover a
469 maturação final do folículo e sua ovulação. Sendo assim, o folículo dominante
470 selecionado durante a fase lútea sofre atresia, e conseqüentemente a produção
471 de estrógeno e inibina diminui, e isso remove o bloqueio de *feedback* negativo
472 sobre a o FSH. Assim, com o aumento da secreção de FSH, emerge uma nova
473 onda folicular (FORDE et al., 2011).

474 O estrógeno tem efeito local no desenvolvimento folicular e sistêmico no
475 mecanismo de *feedback* positivo no hipotálamo e hipófise. Nesse caso, durante a
476 fase folicular, quando as concentrações de progesterona são altas, o estrógeno
477 produzido pelo folículo dominante pré-ovulatório atua induzindo aumento de
478 GnRH pelo hipotálamo, esse por sua vez promove aumento na amplitude e na
479 frequência da pulsatilidade de LH, sendo suficiente para estimular a maturação
480 final e ovulação (SUNDERLAND et al., 1994; CROWE, 2008).

481 A inibina por sua vez, que é sintetizada pelo folículo dominante, tem o
482 papel de causar atresia dos demais folículos e sinalizar a hipófise anterior para
483 priorizar a liberação de LH, que vai finalizar a maturação do folículo, desencadear
484 a ovulação e formação do CL (FIGUEIREDO et al., 1997). A formação do CL

485 acontece de forma gradual durante os 10 primeiros dias após ovulação até
486 alcançar o máximo de sua atividade e tamanho. O CL é responsável pela
487 produção de progesterona que, ao atuar através de um mecanismo de
488 retroalimentação negativa, inibe a liberação de LH e a partir disso o endométrio
489 passa a exercer sua função secretora. As glândulas endometriais crescem e
490 passam a secretar um fluido responsável pela nutrição do embrião até que
491 aconteça a implantação uterina (REECE, 1996).

492 O reconhecimento materno da gestação ocorre entre o 15^o e o 17^o dia
493 após a concepção, devido à presença do *inteferon-tau* (INF τ) que é produzido
494 pelo trofoblasto do embrião em desenvolvimento (LAMB et al., 2010). Quando
495 não há gestação, por meio de ligação de ocitocina o endométrio então passa a
496 produzir PGF2 α , que tem como função causar a luteólise e conseqüentemente
497 uma grande queda na concentração de progesterona. A partir disso, o hipotálamo
498 recebe sinalização para voltar a liberar GnRH, reiniciando um novo ciclo estral
499 (REECE, 1996).

500

501 3.4 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS (CFA)

502

503 O avanço no uso de biotecnologias reprodutivas como a IA, IATF e a
504 produção *in vitro* de embriões, coloca em destaque a importância do estudo da
505 contagem de folículos antrais (CFA) e sua relação com a fertilidade e
506 desempenho reprodutivo das fêmeas (IRELAND et al., 2008; IRELAND et al.,
507 2011; PONTES, et al., 2011; MOROTTI et al., 2015; MOROTTI et al., 2017;
508 SENEDA et al., 2019; LIMA et al., 2020; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2021), uma vez
509 que, segundo esses estudos o número de folículos antrais apresenta relação
510 direta com número de embriões produzidos pelas doadoras e fertilidade de
511 fêmeas em programas reprodutivos (PONTES et al., 2011).

512 A população total de folículos ovarianos compreende os folículos pré-
513 antrais e antrais e apresenta-se com alta variabilidade entre os indivíduos
514 (ERICKSON, 1966), no entanto já foi demonstrado que a média de folículos pré-
515 antrais é semelhante entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (SILVA-SANTOS et al.,
516 2011). Apesar disso, a população de folículos antrais ovarianos apresenta grande
517 diferença numérica entre as raças e alguns autores atribuem essa diferença a
518 possibilidade de haver uma menor taxa de atresia folicular das fêmeas zebuínas

519 em relação às taurinas (SILVA-SANTOS et al., 2011; BATISTA et al., 2014).
520 Nesse sentido, Bastos et al. (2010) observaram que fêmeas zebuínas (*Bos*
521 *indicus*) apresentavam maior número de folículos do que vacas taurinas (*Bos*
522 *taurus*) ($42,7 \pm 5,9$ vs. $19,7 \pm 3,2$), resultado semelhante também foi encontrado
523 por Alvarez et al. (2000), Carvalho et al. (2008), Gimenes et al. (2008) e Batista et
524 al. (2014).

525 Apoiando essa ideia, foram observadas maiores concentrações de insulina
526 e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) em zebuínos, o que
527 justifica o maior número de folículos recrutados em fêmeas *Bos indicus* do que em
528 *Bos taurus* (SEGERSON et al., 1984; BATISTA et al., 2014). Comparando os
529 animais com alta CFA de ambas as origens, observa-se que fêmeas *Bos indicus*
530 apresentam número maior de folículos ($48,1 \pm 2,33$) do que as *Bos taurus* ($34,3 \pm$
531 $3,12$), e da mesma forma acontece com a baixa CFA, onde animais *Bos taurus*
532 apresentam menor CFA ($13,4 \pm 1,4$) do que *Bos indicus* ($28,4 \pm 2,15$) de baixa
533 CFA (BATISTA et al., 2014).

534 Embora já tenha sido relatada a alta variabilidade individual da CFA, ela
535 apresenta características de alta repetibilidade no indivíduo, tendo sido observada
536 primeiramente em fêmeas *Bos taurus* com auxílio do exame ultrassonográfico. A
537 partir de então, surgiu a possibilidade de classificação das fêmeas em grupos de
538 acordo com o número de folículos observados, tais como baixa, intermediária e
539 alta CFA. Além disso, ficou sugerido que a avaliação e CFA poderia ser realizada
540 em qualquer estação do ano e independente do número de ondas foliculares, fase
541 de desenvolvimento, idade, status lactacional (BURNS et al., 2005) e ordem de
542 parição (KOYAMA et al., 2018). Foi observada alta repetibilidade individual da
543 CFA também em animais cruzados monitorados durante alguns meses (Braford;
544 SILVA-SANTOS et al., 2014; Girolando; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2015).

545 Em relação a fertilidade, a presença de alta CFA em fêmeas *Bos taurus*
546 demonstrou melhor taxa de prenhez (MOSSA et al., 2012), desempenho
547 reprodutivo (KOYAMA et al., 2018), além de menor intervalo entre partos e maior
548 probabilidade de estro no período pós-parto (MARTINEZ et al., 2016). Ao
549 contrário do que se esperava para animais *Bos indicus* a tendência seguiu outro
550 caminho, para essas raças as melhores taxas de prenhez foram observadas em
551 animais de baixa CFA (MENDONÇA et al., 2013; SANTOS et al., 2016; MOROTTI
552 et al., 2018). Embora tenha sido sugerida para fêmeas *Bos taurus*, a seleção para

553 eficiência reprodutiva utilizando como critério a CFA (IRELAND et al., 2008;
554 IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012), é preciso lembrar que o desempenho
555 reprodutivo também é influenciado por outros mecanismos (MOROTTI et
556 al.,2015), tais como os envolvidos na síntese e metabolização de hormônios
557 esteroides (estrógeno e progesterona), atuação da insulina e do IGF-1, além das
558 condições nutricionais, sanitárias e genética dos animais (SEGERSON et al.,
559 1984; BASTOS, 2012; BATISTA et al. 2014).

560 Na produção *in vitro* de embriões, fêmeas *Bos taurus* que apresentaram
561 alta CFA foram capazes de produzir 4 vezes mais embriões do que fêmeas com
562 baixa CFA. No entanto, quando as fêmeas foram submetidas a protocolos de
563 superovulação com FSH, o número de embriões aptos para transferência foi
564 maior para o grupo de embriões oriundos de fêmeas com baixa CFA, o que
565 revelou melhor qualidade dos embriões oriundos de fêmeas com baixa CFA
566 (IRELAND et al., 2007). Enquanto isso, para a raça Nelore, fêmeas com alta CFA
567 apresentaram aproximadamente dez vezes mais oócitos e produziram cerca de
568 30 vezes mais embriões em relação as de baixa CFA (SANTOS et al., 2016).

569 Em uma tentativa de investigar o efeito da CFA na expressão de mRNA de
570 genes envolvidos na qualidade de oócitos de fêmeas Nelore, Rosa et al. (2018)
571 realizaram a a quantificação de mRNA de genes presentes nas células da
572 granulosa e do *cumulus* e que estão diretamente relacionados com a oogênese e
573 foliculogênese. Embora tenham sido observadas expressões de mRNA diferentes,
574 não foram encontradas diferenças nas taxas de clivagem e blastocistos em
575 embriões de oócitos provenientes de fêmeas com baixa e alta CFA, revelando
576 que a variação na expressão gênica não interfere na competência de
577 desenvolvimento *in vitro* dos embriões. Ainda nesse sentido, mais recentemente
578 Lima et al. (2020) também investigaram o padrão de transcrição de genes
579 importantes para o desenvolvimento das células foliculares entre oócitos e células
580 do *cumulus* de fêmeas Nelore com baixa e alta CFA. Nessa investigação ficou
581 evidente que oócitos e células do *cumulus* de novilhas Nelore com baixa CFA
582 exibiram padrões de expressão distintos dos genes relacionados aos processos
583 citados, no entanto o padrão de expressão não pode ser explicado.

584 A CFA está positivamente associada com as concentrações do Hormônio
585 Anti-mülleriano (AMH) em fêmeas bovinas, ou seja, para ambas as origens, *Bos*
586 *taurus* e *Bos indicus*, o AMH atua como um marcador endócrino para predizer a

587 população de folículos. Os animais que possuem maior CFA, apresentam
588 concentração plasmática de AMH mais elevada. Um estudo demonstrou que
589 novilhas *Bos indicus* possuem maiores concentrações de AMH quando
590 comparadas as novilhas *Bos taurus* (1,0 vs. 0,3 ng/mL, $P < 0,05$), confirmando a
591 hipótese pelo fato de fêmeas zebuínas apresentarem maior número de folículos
592 (BATISTA et al., 2014).

593 A fim de elucidar os mecanismos que envolvem CFA e fisiologia e funções
594 de ovidutos, recentemente procurou-se esclarecer uma possível relação entre a
595 CFA e a modulação da expressão gênica nos ovidutos de *Bos indicus* e *Bos*
596 *taurus*. Os resultados evidenciaram não haver influência da CFA sobre a
597 expressão dos genes relacionados ao transporte no oviduto, formação de
598 reservatórios de espermatozoides e interação entre os gametas, e sim parecem
599 estar relacionados com o microambiente e suas diferenças entre os lados
600 ipsilateral e contralateral a ovulação. Embora a relação entre a CFA e a
601 expressão gênica no oviduto tenha sido mínima, ela existe e deve ser
602 considerada. No entanto, assim como em outros estudos envolvendo expressões
603 gênicas e a CFA, maiores investigações devem ser realizadas para melhor
604 compreender esses mecanismos (FONTES et al., 2018).

605 Em relação a herdabilidade da CFA, poucos são os relatos que revelam
606 essa característica em fêmeas *Bos indicus*. Para animais *Bos taurus* já foram
607 relatadas herdabilidades com valor moderado em bovinos leiteiros (entre 0,25 e
608 0,31) (WALSH et al., 2014), e alto para animais da raça Brangus (0,73)
609 (SNELLING et al. 2012). Entre a maioria das características de fertilidade, os
610 valores encontrados para herdabilidade da CFA foram maiores, uma vez que a
611 maior parte apresenta herdabilidade baixa, normalmente com valores em torno de
612 5% em bovinos (BERGLUND, 2008; CAMMACK et al., 2009). Esses valores para
613 herdabilidade encontrados indicam que, quando for de interesse repetir essa
614 característica nas progênes, a seleção para CFA pode ser realizada.

615 Considerando a relação da CFA com a fertilidade, esse parâmetro tem sido
616 utilizado como uma forma de seleção para fêmeas bovinas. Nesse sentido, foram
617 avaliadas, para fêmeas mestiças (Braford), as correlações entre o número de
618 folículos e os parâmetros utilizadas por programas de melhoramento genético,
619 com o objetivo de mensurar a influência dessa forma de seleção sobre a
620 classificação por mérito genético dos animais (MOROTTI et al., 2017). No entanto,

621 não foram encontradas correlações significativas. A partir desse resultado, ficou
 622 sugerido pelos autores que a seleção de fêmeas com base na CFA não interfere
 623 na seleção utilizada para o melhoramento genético no programa estudado.

624 Diante de inúmeros mecanismos que ainda precisam ser compreendidos, a
 625 relação da CFA com as características reprodutivas continua sendo estudada por
 626 diversos grupos de pesquisa. No entanto, um dos maiores entraves para a
 627 discussão que envolvem os resultados, são as divisões propostas pelos grupos,
 628 que classificam a CFA em baixa, intermediária e alta CFA. Na grande maioria das
 629 vezes, são considerados quartis em relação a realidade individual de cada
 630 propriedade, o que dificulta, além da discussão dos resultados, a extrapolação
 631 dos dados para as diferentes realidades regionais. Para animais *Bos taurus* a
 632 classificação mais aceita é ≤ 15 folículos para baixa CFA, 16-24 folículos para
 633 CFA intermediária e ≥ 25 folículos para alta CFA (BURNS et al., 2005; IRELAND
 634 et al., 2007; IRELAND et al., 2008; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; MOSSA et
 635 al., 2012; NAGAI et al., 2016). No entanto, são descritas outras formas de
 636 classificação por diferentes autores (Tabela 1).

637

638 Tabela 1 - Classificações propostas para contagem de folículos antrais (CFA) em animais de
 639 origem *Bos taurus*

Autores	Baixa CFA	Média CFA	Alta CFA
Burns et al. (2005) Ireland et al. (2007) Ireland et al. (2008) Jimenez-Krassel et al. (2009) Mossa et al. (2012) Nagai et al. (2016)	≤ 15	16 a 24	≥ 25
Martinez et al. (2016) Koyama et al. (2018)	< 11	11 a 15	> 15

640

641 Para animais de raças de *Bos indicus* e mestiços (*Bos indicus* x *Bos*
 642 *taurus*) há uma divergência ainda maior quanto a classificação da CFA e são
 643 encontradas na literatura diversas formas diferentes de abordagem em baixa,
 644 intermediária e alta CFA (Tabela 2).

645

646

647 Tabela 2 - Classificações propostas para contagem de folículos antrais (CFA) em animais de
 648 origem *Bos indicus*

Autores	Baixa CFA	Média CFA	Alta CFA
Silva-Santos et al. (2014)	≤ 10	> 10 e < 40	≥ 40
Baruselli et al. (2014)	$28,8 \pm 0,8$	$50,3 \pm 0,7$	$74,7 \pm 0,6$
Rodrigues et al. (2015)	≤ 32	> 32 e < 48	≥ 48
Morotti et al. (2017)	≤ 11	> 12 e < 40	> 40
Santos et al. (2016)	≤ 10	> 16 e < 20	≥ 25
Morotti et al. (2018)	≤ 15	≥ 20 e ≤ 40	≥ 45

649

650 As diversas classificações retratadas nas tabelas 1 e 2 reforçam a
651 necessidade de que se estabeleça padrão para categorizar a CFA, uma vez que
652 os resultados encontrados poderão ser recomendados para outros rebanhos e
653 partir disso as discussões dos trabalhos terão maior acurácia, contribuindo para
654 maiores esclarecimentos dessa característica com o desempenho reprodutivo dos
655 animais e conseqüentemente melhores resultados produtivos e econômicos na
656 pecuária.

657

658 3.4.1 CFA e a fertilidade

659

660 Apesar dos inúmeros avanços nos estudos da relação entre a CFA, o
661 desempenho reprodutivo e a eficiência das biotécnicas reprodutivas em bovinos,
662 muitos aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva das fêmeas permanecem
663 desconhecidos, principalmente às diferenças entre as subespécies (*Bos taurus*
664 *taurus* vs *Bos taurus indicus*). Além disso, as particularidades relacionadas à
665 população de folículos antrais ovarianos e sua influência na fertilidade dos
666 rebanhos não está esclarecida (MOROTTI et al., 2015 12; SENEDA et al., 2019
667 15).

668

669 Estudos anteriores sugeriram que o número de folículos antrais pode afetar
670 a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário em bovinos (SILVA-
671 SANTOS et al., 2014). A CFA também já foi descrita como um marcador de
672 características reprodutivas, como os níveis circulantes de hormônio anti-
673 Mülleriano (AMH; STOJSIN-CARTER et al., 2016), testosterona (MARTINEZ et
674 al., 2016), qualidade do oócito (IRELAND et al., 2009), resposta a tratamentos de
675 superovulação (IRELAND et al., 2007), número e qualidade de embriões

675 produzidos *in vitro* (PONTES et al., 2011; SANTOS et al., 2016) e taxas de
676 prenhez (MOSSA et al., 2012; MARTINEZ et al., 2016).

677 A CFA tem sido utilizada como critério de seleção para fêmeas bovinas
678 doadoras de oócitos para produção de embriões *in vitro* (PONTES et al., 2010,
679 2011). No entanto, resultados contraditórios foram encontrados quanto a
680 correlação entre desempenho reprodutivo e CFA, incluindo fertilização (NAGAI et
681 al., 2015) e taxas de concepção (SANTOS et al., 2016), níveis circulantes de
682 testosterona (LOUREIRO et al. 2016), e a expressão de AMH em células da
683 granulosa (STOJSIN-CARTER et al., 2016).

684 Fêmeas de raças taurinas com baixa CFA são associadas a diversos
685 aspectos negativos da fertilidade, como ovários pequenos e um pequeno número
686 de folículos com oócitos morfológicamente saudáveis (IRELAND et al., 2008), pior
687 desempenho reprodutivo ao final da estação reprodutiva (MOSSA et al., 2012)
688 responsividade reduzida ao tratamento de superovulação e uma pequena
689 proporção de embriões transferíveis (IRELAND et al., 2007; MOSSA et al., 2012),
690 baixas concentrações de progesterona e AMH circulantes (P4) e hormônio anti-
691 Mulleriano (EVANS et al., 2012; IRELAND et al., 2011; IRELAND et al., 2008) e
692 redução da espessura endometrial (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

693 Os oócitos oriundos de fêmeas taurinas com baixa CFA apresentam uma
694 abundância maior de marcadores intrafoliculares de baixa qualidade (IRELAND et
695 al., 2011). Bettegowda et al. (2008) avaliaram células cumulus e oócitos e os
696 resultados mostraram que os animais com baixa CFA apresentaram 2 e 6 vezes
697 mais abundância de mRNAs de catepsina-B e catepsina-S, respectivamente, em
698 células cumulus em comparação com animais com alta CFA. Esses transcritos de
699 mRNA são encontrados em maior abundância nas células cumulus de oócitos
700 bovinos em metáfase II que se desenvolvem em baixa porcentagem até o estágio
701 de blastocisto, uma vez que, a inibição da atividade da catepsina durante a
702 maturação *in vitro* aumenta significativamente a taxa de desenvolvimento
703 embrionário até o estágio de blastocisto (BETTEGOWDA et al. 2008). Por isso, a
704 expressão elevada de catepsinas nas células do cumulus de animais com baixa
705 CFA, indica que a qualidade oocitária está comprometida.

706 Por outro lado, para fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) além dos
707 resultados de melhor taxa de prenhez obtidos nos programas de IATF, Morotti et
708 al. (2018) revelaram que alguns aspectos da dinâmica folicular ovariana, como um

709 maior diâmetro do folículo dominante e pré-ovulatório nos programas de IATF,
710 são mais favoráveis para o grupo de baixa CFA. A correlação positiva entre o
711 tamanho do folículo dominante no momento da IATF e a maior taxa de gestação
712 já está bem estabelecida (SA FILHO et al., 2010; PFEIFER et al., 2012). No
713 entanto, as razões específicas para tal fato precisam ser melhor investigadas em
714 nível celular e molecular (LIMA et al., 2020).

715 Sabe-se que os processos de oogênese e foliculogênese são dependentes
716 das interações entre o oócito e as células foliculares. Mais especificamente, as
717 comunicações parácrinas bidirecionais entre o oócito e as células da granulosa e
718 da teca são essenciais para que a foliculogênese aconteça de forma adequada e
719 haja o crescimento do oócito, aquisição de competências meióticas e
720 desenvolvimento do oócito para ser capaz de sustentar o desenvolvimento
721 embrionário inicial (EPPIG, 2001; YANG et al., 2016). Muitos genes são
722 conhecidos por estarem envolvidos na comunicação molecular entre o complexo
723 cumulus oócito e as células da granulosa que regulam o desenvolvimento folicular
724 e oocitário (KATZ-JAFFE, et al., 2009; MAMO et al., 2011).

725 As investigações sobre a qualidade dos oócitos produzidos *in vitro* oriundos
726 de fêmeas Nelore foram descritas através da quantificação de mRNA de genes
727 presentes nas células da granulosa e do *cumulus* e que estão diretamente
728 relacionados com a oogênese e foliculogênese. Foi observado em células da
729 granulosa de animais com baixa CFA (≤ 31) maior expressão de mRNA NPR-2 e
730 NPR-3 (envolvidos na retomada da meiose), FGF10 (relacionados a expansão
731 das células do cumulus) e STAT3 (fator de transcrição da maturação oocitária e
732 proliferação celular). Ainda nessa investigação, foi observado que as células da
733 granulosa de oócitos provenientes de fêmeas com alta CFA (≥ 92) apresentam
734 maior expressão dos genes PGR e AMHR2a, envolvidos na retomada da meiose
735 e expansão das células do cumulus. Embora tenham sido observadas expressões
736 de mRNA diferentes, não foram encontradas diferenças nas taxas de clivagem e
737 blastocistos em embriões de oócitos provenientes de fêmeas com baixa e alta
738 CFA, revelando que a variação na expressão gênica dos genes estudados não
739 interfere na competência de desenvolvimento *in vitro* dos embriões (ROSA et al.,
740 2018).

741 Nesse mesmo sentido, Lima et al. (2020) investigaram o padrão de
742 transcrição de genes importantes para o desenvolvimento das células foliculares

743 entre oócitos e células do *cumulus* de fêmeas Nelore com baixa e alta CFA. Entre
744 os transcritos estudados estavam genes envolvidos na comunicação intercelular,
745 controle meiótico, modulação epigenética, divisão celular, crescimento folicular,
746 manutenção celular, esteroidogênese, estresse celular e resposta ao estresse
747 celular. Nessa investigação ficou evidente que oócitos e células do *cumulus* de
748 novilhas Nelore com baixa CFA exibiram padrões de expressão distintos dos
749 genes relacionados aos processos citados. Esses dados são consistentes com o
750 fato de que muitas proteínas e fatores de crescimento são produzidos e
751 armazenados nos oócitos durante o crescimento folicular (READER et al., 2001) e
752 a competência oocitária é alcançada à medida que o folículo dominante cresce
753 (ARLOTTO et al., 1996). No entanto há necessidade de maiores investigações
754 para melhor compreender os detalhes de tais diferenças.

755 Esses resultados inconsistentes e até mesmo controversos dos diversos
756 estudos envolvendo a CFA mostram que ainda há muitos desafios e, muitos
757 aspectos e mecanismos da relação entre a CFA e a fertilidade que precisam ser
758 esclarecidos. Um perfil de expressão gênica global por meio de RNAseq poderia
759 explicar melhor os dados de fertilidade em campo.

760

761 3.5 FLUIDO FOLICULAR E A FERTILIDADE

762

763 O líquido folicular, ou também conhecido como fluido folicular, é o líquido
764 presente no antro dos folículos em desenvolvimento, produzido pela corrente
765 sanguínea e por secreções das células somáticas no interior do folículo
766 (FORTUNE, 1994; REVELLI et al., 2009). O oócito está contido nesse líquido, e
767 esse por sua vez é responsável por realizar a mediação da comunicação entre os
768 mais diversos tipos celulares presentes no folículo (HENNET E COMBELLES,
769 2012). Portanto, uma vez que o fluido folicular fornece um microambiente
770 apropriado para o oócito que leva ao desenvolvimento embrionário adequado, ele
771 é parcialmente responsável pela qualidade do embrião (MCNATTY, 1987;
772 BENDER et al., 2010). Pode-se afirmar que a composição do líquido folicular é
773 um potencial marcador de qualidade oocitária e embrionária, pois é o reflexo do
774 metabolismo dos folículos além de conter moléculas reguladoras que são
775 essenciais para a maturação dos oócitos (WALLACE et al., 2012).

776 A análise do ambiente folicular é uma excelente estratégia utilizada no
777 desenvolvimento de métodos não invasivos para a seleção de oócitos e embriões.
778 Como o fluido folicular é um subproduto da recuperação de oócitos, na rotina,
779 torna-se a amostra ideal para esses estudos (WALLACE et al., 2012). Atualmente,
780 o fluido folicular tem sido amplamente utilizado para conservação e maturação de
781 oócitos, e seu uso se justifica pelo alto teor de proteínas encontrado em sua
782 constituição, ainda maior que o apresentado pelo soro fetal bovino, comumente
783 utilizado para essa finalidade (LEHMKUHL et al., 2002).

784 A composição do líquido folicular influencia a capacidade de
785 desenvolvimento do oócito, e esse fato é apoiado principalmente em alguns
786 componentes do fluido folicular que são de extrema importância na diferenciação
787 do oócito como: espécies reativas de oxigênio (ROS), antioxidantes, proteínas,
788 metabólitos, hormônios e fatores de crescimento (REVELLI et al., 2009; HENNET;
789 COMBELLES, 2012). O perfeito equilíbrio entre as ROS e os antioxidantes nesse
790 ambiente é essencial, pois quando presente em baixos níveis, as ROS são
791 indispensáveis para as funções celulares normais e para as vias de sinalização.
792 Por outro lado, quando presente em níveis excessivos as ROS podem acarretar
793 desorganização dos microtúbulos, no alinhamento dos fusos cromossômicos da
794 metáfase II em oócitos *in vitro* (CHOI et al., 2007), e até mesmo inibir a maturação
795 em oócitos de ratas (TAMURA et al., 2008).

796 Estudos proteômicos usando tecnologia de espectrometria de massa (MS)
797 demonstraram que o fluido folicular apresenta uma composição proteica complexa
798 (SCHWEIGERT et al., 2006; ANGELUCCI et al., 2006), principalmente de
799 proteínas compatíveis com o plasma (HANRIEDER et al., 2008). A análise de
800 proteínas plasmáticas do fluido folicular de mulheres submetidas à fertilização *in*
801 *vitro* (FIV) que ficaram gestantes revelou que o proteoma remanescente contém
802 proteínas com processos biológicos específicos, envolvendo complemento e
803 metabolismo lipídico (JARKOVSKA et al., 2010). Estudando mais a fundo o
804 proteoma do fluido folicular em relação ao resultado da FIV, foi encontrado um
805 maior número de proteínas envolvendo as vias biossintéticas que correspondem
806 aos oócitos de melhor qualidade que resultaram em gestação *versus* resultados
807 negativos de gravidez (KUSHNIR et al., 2012). Esses resultados potencializam o
808 exame do proteoma do fluido folicular para tornar-se biomarcador adicional para a
809 qualidade dos oócitos.

810 Os metabólitos presentes no líquido folicular são compartilhados com
811 oócito e são responsáveis pelo fornecimento dos componentes intracelulares
812 necessários para que aconteça a diferenciação oocitária. Entre esses metabólitos
813 são encontrados os aminoácidos, lipídios, nucleotídeos e outras pequenas
814 moléculas oriundas tanto da corrente sanguínea quanto da atividade metabólica
815 das células somáticas foliculares (HENNET; COMBELLES, 2012; DUMESIC et al.,
816 2015).

817 As concentrações de hormônios no fluido folicular (FF) atuam na
818 diferenciação do oócito, de forma direta (ação genômica e não-genômica) e
819 indiretamente (por meio de células somáticas dentro do folículo). Os principais
820 hormônios presentes no FF são FSH, LH, hormônio de crescimento (GH),
821 progesterona, estradiol, além dos hormônios metabólicos IGF-1 e insulina
822 (HENNET; COMBELLES, 2012).

823 O IGF-I e insulina são importantes mediadores da esteroidogênese e
824 proliferação das células da granulosa por meio da ação de mecanismos
825 autócrinos e parácrinos (KAWASHIMA et al., 2007). Na vaca, o nível de IGF-I no
826 fluido folicular é reflexo da concentração sérica, enquanto o IGF-II é derivado
827 localmente a partir das células da teca, com a função de suporte ao crescimento
828 folicular e esteroidogênese (MAGALHÃES et al., 2012). O IGF-I aumenta a
829 resposta ovariana às gonadotrofinas além de estimular a proliferação de células
830 foliculares e a produção de estradiol. A insulina atua diretamente no crescimento
831 de folículos antrais, estimulando a produção de estradiol, possuindo ação
832 mitogênica semelhante ao IGF-I (LLEWELLYN et al., 2007).

833 O envolvimento do IGF-I nos estágios iniciais da foliculogênese foi
834 evidenciado por estudos em que o nocaute do gene comprometeu severamente o
835 desenvolvimento pré-antral e o antral inicial em camundongos (ELVIN E MATZUK,
836 1998). Já foi demonstrada a presença de IGF-I nas células da granulosa de
837 folículos antrais saudáveis de suínos e roedores (ZHOU et al., 1996), e em
838 bovinos o IGF-I foi responsável pelo crescimento de pequenos folículos antrais *in*
839 *vitro*, além de aumentar a viabilidade de oócitos (WALTERS et al., 2006),
840 estimular a proliferação e a sobrevivência das células da granulosa, prevenindo a
841 apoptose (QUIRK et al., 2004). Além disso, pesquisas demonstraram que a ação
842 de IGF-I em grandes folículos secundários aumentou a incidência de dominância
843 folicular e ovulação (GINTHER et al., 2008). Em um experimento realizado *in vivo*,

844 Velazquez et al. (2009) observaram que o IGF-I exerce importante função no
845 desenvolvimento folicular, na qualidade oocitária, e no posterior desenvolvimento
846 embrionário em novilhas não superovuladas.

847 Nos últimos anos, tem sido observada uma tendência em diminuir as
848 pesquisas de marcadores moleculares únicos e apostar em técnicas mais
849 complexas que estudam todos os metabólitos do fluido folicular (REVELLI et al.,
850 2009). A identificação de biomarcadores e explicações plausíveis para as
851 alterações na composição de metabólitos irão possibilitar a identificação e a
852 padronização de um método não invasivo de qualidade oocitária (WALLACE et
853 al., 2012).

854 Diante do que foi exposto nos itens anteriores, pode-se afirmar que a
855 pesquisa dos componentes do fluido folicular é de grande importância para a
856 elucidação de diversos resultados encontrados na fertilidade dos rebanhos.
857 Atualmente a seleção de fêmeas pela CFA também precisa ser melhor
858 esclarecida, e há fortes indícios de que alguns pontos-chaves possam ser
859 compreendidos por meio da avaliação do fluido folicular de fêmeas com diferentes
860 números de folículos antrais.

861

862 3.6 TRANSCRIPTOMA E A FERTILIDADE

863

864 O transcriptoma, pode gerar informações sobre o metabolismo e
865 funcionamento celular, além de fornecer evidências para interpretar os elementos
866 funcionais do genoma (WANG et al., 2009). Em geral, os transcritos são obtidos
867 pelo uso de tecnologias de hibridização (microarranjos) e de sequenciamento de
868 RNA (RNA-seq), e as principais aplicações desses estudos são para catalogar
869 mRNAs e RNAs não codificantes, a fim de identificar novos genes, analisar
870 expressão diferencial e estudar as redes de co-expressão (HAN et al., 2015).

871 Diversos esforços têm sido direcionados para elucidar os processos
872 envolvidos na biologia reprodutiva, e nesse sentido os estudos da biologia
873 molecular tem se destacado, pois as técnicas disponíveis permitem conhecer o
874 DNA, RNA e diversas proteínas, e assim conhecer genes que regulam e
875 influenciam na fertilidade das fêmeas bovinas (SENDER et al., 2011;
876 FAVORETO et al., 2018).

877 Análise de transcriptoma por sequenciamento de RNA (MORTAZAVI et al.,
878 2008) permite conhecer o processo global de transcrição de uma célula ou tecido
879 com riqueza de detalhes. A técnica de RNA-seq é uma abordagem muito utilizada
880 pois com ela o perfil de um transcrito pode ser caracterizado diretamente por meio
881 de sequenciamento, sem a necessidade de conhecimento prévio do
882 transcriptoma. Estas tecnologias vem sendo o foco de vários estudos recentes
883 que demonstraram alta resolução e acurácia na quantificação e descoberta de
884 transcritos, bem como na análise de modulação pós transcricional da expressão
885 gênica e variações moleculares. De modo geral, as etapas de um experimento
886 com RNA-seq envolvem isolar todos os RNAs de uma célula, convertê-los em
887 cDNA, sequenciar os fragmentos de cDNA em um sequenciador de nova geração,
888 mapear os fragmentos ao genoma de referência, identificar variações de splice,
889 descobrir novos transcritos e quantificar a expressão de transcritos (CASTAN,
890 2014). Por todos os motivos já citados anteriormente nessa revisão, o uso de
891 RNA-seq para gerar os perfis transcriptômicos de oócitos e embriões tem se
892 mostrado como grande potencial para esclarecer questões importantes na
893 biologia reprodutiva como os fatores que influenciam na fertilidade das fêmeas
894 bovinas.
895
896

897 **3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

898

899 ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. I. Impact of
900 nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading
901 to hyperinsulinemia in cattle. **Biol.Reprod.**, v. 73, p. 918-926, 2005.

902

903 ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; D'ERCOLE, A.J.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK,
904 J.J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth
905 and function. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 400-420, 1985.

906

907 ALENCAR, M.M.; COSTA J.L.; CORREA, L.A. Desempenho reprodutivo de
908 fêmeas das raças canchim e nelore. **Pesq. Agropec., Bras.**, v. 22, n.7, p. 753-
909 758, 1987.

910

911 ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.;
912 STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian
913 and endocrine characteristics during anestrus cycle in Angus, Brahman, and
914 Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, p.
915 1291-1302, 2000.

916

917 AMSTALDEN, M.; HARMS, P.G.; WELSH JR, T.H.; RANDEL, R.D.; WILLIAMS,
918 G.L. Effects of leptin on gonadotropin releasing hormone release from
919 hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from
920 adenohipophyseal primary cell cultures: further evidence that normally-nourished
921 cattle are resistant to leptin. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 85, p. 41-52, 2005.

922

923 ANDERSON, R.A.; ZWAIN, I.H.; ARROYO, A.; MELLON, P.L.; YEN, S.S. The
924 insulin like growth factor system in GT1-7cells. **Endocrinol.**, v. 70, p. 353-359,
925 1999.

926

927 ANGELUCCI, S.; CIAVARDELLI, D.; DI GIUSEPPE, F.; ELEUTERIO, E.;
928 SULPIZIO, M.; TIBONI, G. M.; GIAMPIETRO, F.; PALUMBO, P.; DI ILIO, C.
929 Proteome analysis of human follicular fluid. **Biochim Biophys Acta.** v. 1794, p.
930 1775-1785, 2006.

931

932 ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.;
933 Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development
934 of bovine oocytes. **Theriogenology.** v. 45, p. 943-956, 1996.

935

936 AZEVEDO, D. M. M. R.; MARTINS FILHO, R.; LOBO, R. N. B.; MALHADO, C. H.
937 M.; LOBO, R. B.; MOURA, A. A. A.; PIMENTA FILHO, E. C. Desempenho
938 reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Rev Bras Zootec.** v.
939 35, p. 988-996, 2006.

940

941 BARNES, M.A.; BIERLEY, S.T.; HALMAN, R.D.; HENDRICKS, D.M. Follicle
942 stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol-17 beta response in GnRH
943 treated prepubertal Holstein heifers. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 459-465, 1980.

944

- 945 BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. H. Relationship
946 between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal**
947 **Reproduction**, v. 12, p. 487-497, 2015.
- 948
949 BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES,
950 L. U.; VIEIRA, L. M.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure
951 optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic**
952 **Animals**. v. 47, p. 134-141, 2012.
- 953
954 BARUSELLI, P.S. **Com desaceleração de 5% em 2022, mercado da IATF**
955 **registra primeiro recuo em 20 anos**. Boletim Eletrônico do Departamento de
956 Reprodução Animal/FMVZ/USP, 7a ed., 2023. Acesso
957 <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>
- 958
959 BASTOS, M. R.; MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.;
960 GUARDIEIRO, M. M.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; PEDROSO, A. M.;
961 SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in non
962 lactating Nelore versus Holstein cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2010.
- 963
964 BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SÁ
965 FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, R.
966 P.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian
967 antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein)
968 heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 448-452, 2014.
- 969
970 BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite
971 concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers
972 and lactating cows. **Reproduction Research**. v. 139, p. 1047-55, 2010.
- 973
974 BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, M.E.; PETERS, K.E.; GARCIA-
975 WINDER, M.; INDER, J.E. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is
976 influenced by level of dietary energy intake. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 1051-1057,
977 1994.
- 978
979 BERGLUND, R. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance.
980 **Reproduction of Domestic Animals**, v. 2, p. 89-95, 2008.
- 981
982 BERGMANN, J.A.G. Indicadores de Precocidade Sexual em Bovinos de Corte. In:
983 CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 1998, Uberaba. **Anais...**
984 Uberaba: Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, 1998, p. 145-155
- 985
986 BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A.
987 Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*.
988 **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p.87-98, 1989
- 989
990 BOLIGON, A. A.; ALBULQUERQUE, L. G.; MERCADANTE, M. E. Z.; LÔBO, R. B.
991 **Associação genética entre a idade ao primeiro parto, ganhos em peso e**
992 **peso adulto em animais da raça Nelore**. In: 46 Reunião Anual da Sociedade
993 Brasileira de Zootecnia, 2009, Maringá, **Anais...** Maringá, p. 1-3, 2009.
- 994

- 995 BRITT, J. H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development
996 and fertility. **The bovine proceedings**. n. 24, p. 39-43,1992.
997
- 998 BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J. J. Interactions between somatic
999 cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**,
1000 v.43, p.543-547, 1990.
1001
- 1002 BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.;
1003 IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle:
1004 evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals,
1005 and an inverse association with serum follicle- stimulating hormone
1006 concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 53-62, 2005.
1007
- 1008 BYERLEY, D. J.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G.; SHORT, R. E.
1009 Pregnancy rates of beef heifers bred either on pubertal or third estrus. **Journal of**
1010 **animal science**. v. 65, p. 645-650, 1987.
1011
- 1012 CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes
1013 of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55,
1014 p.27-36,1979.
1015
- 1016 CAMMACK, K. M.; THOMAS, M. G.; ENNS, R. M. Reproduction traits and their
1017 heritabilites in beef cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 25, p. 517-528,
1018 2009.
1019
- 1020 CAMPBELL, B.K. The modulation of gonadotrophic hormone action on the ovary
1021 by parácrino and autocrine factors. **Anat. Histol. Embryo1.**, v. 28, p. 247-251,
1022 1999.
1023
- 1024 CARROL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G.
1025 Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary
1026 follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.321-327, 1990.
1027
- 1028 CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A.
1029 H.; 15 BARUSELLI, P. A. Effects of early luteolysis in progesterone-based timed
1030 AI 16 protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers.
1031 **17 Theriogenology**, v. 69, p. 169-175, 2008.
1032
- 1033 CASTAN, E.P. **Transcriptoma do músculo longissimus dorsi de bovinos**
1034 **machos adultos da raça Nelore**. 2014. Tese (doutorado) - Universidade
1035 Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal,
1036 2014. 80p.
1037
- 1038 CHENOWETH, P. J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a
1039 review. **Aust Vet J.** v. 71, p. 422-426, 1994.
1040
- 1041 CHOI, W.J.; BANERJEE, J.; FALCONE, T. BENA, J.; AGARWAL, A.; SHARMA,
1042 R. K. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in
1043 metaphase II mouse oocyte spindle structure. **Fertility and Sterility**. v.88, p.
1044 1220-1231, 2007.

- 1045
1046 CROWE, M.A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows.
1047 **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.5, p.20-28, 2008.
1048
- 1049 DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J, E.
1050 Endocrine mechanism of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol
1051 receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion.
1052 **Biol Reprod**. v. 37, p. 1054-1065, 1987.
1053
- 1054 DAY, M. L.; NOGUEIRA, G. P. Management of age at puberty in beef heifers to
1055 optimize efficiency of beef production. **Animal Frontiers**, v. 3, p. 6–11, 2013.
1056
- 1057 DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine
1058 mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol
1059 receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion.
1060 **Biol Reprod**, v. 37, p. 1054-1065, 1987.
1061
- 1062 DICKINSON, S. E.; ELMORE, M. F.; KRIESE-ANDERSON, L.; ELMORE, J. B.;
1063 WALKER, B. N.; DYCE, P. W.; RODNING, S. P.; BIASE, F. H. Evaluation of age,
1064 weaning weight, body condition score, and reproductive tract score in pre-selected
1065 beef heifers relative to reproductive potential. **Journal of Animal Science and**
1066 **Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2019.
1067
- 1068 DUMESIC, D.A.; MELDRUM, D.R.; KATZ-JAFFE, M.G.; KRISHER, R.L.;
1069 SCHOOLCRAFT, W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are
1070 critical for oocyte health. **Fertil Steril**. v.103, p. 303-316, 2015.
1071
- 1072 EBLING, F.J.P.; WOOD, R.I.; KARSCH, F.J.; VANNERSON, L.A.; SUTTIE, J.M.;
1073 BUCHOLTZ, D.C.; SCHALL, R.E.; FOSTER, D.L. Metabolic interfaces between
1074 growth and reproduction: III. Central mechanisms controlling pulsatile LH secretion
1075 in the nutritionally growth-limited female lamb. **Endocrinol.**, v. 126, p. 2719-2727,
1076 1990.
1077
- 1078 ELVIN, J.A.; MATZUK, M.M. Mouse models of ovarian failure. **Rev Reprod**, v.3,
1079 p.183-195, 1998
1080
- 1081 EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; GONÇALVES, P. E. M.; MARTINS, J. A. M.; LEITE,
1082 T. G.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. Aspectos relevantes sobre a
1083 puberdade em fêmeas. **Rev Bras Reprod Anim**. v. 33, p. 11-19, 2009.
1084
- 1085 EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; GONÇALVES, P. E. M.; MARTINS, J. A. M.; LEITE,
1086 T. G.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. Aspectos relevantes sobre a
1087 puberdade em fêmeas. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, p. 11-19, 2009.
1088
- 1089 EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in
1090 mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-838, 2001.
1091
- 1092 ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary.
1093 **Journal of Animal Science**, v. 25, p. 800-805, 1966.
1094

- 1095 EVANS, A.C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL,
1096 F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of maternal
1097 environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for
1098 fertility in bovine offspring. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p. 31–37,
1099 2012
- 1100
- 1101 FARNWORTH, P.G. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH
1102 leave a gonadotroph?. **Journal of Endocrinology**, v.145, p.387-395, 1995.
- 1103
- 1104 FERRAZ FILHO, P. B.; RAMOS, A. A.; SILVA, L. O. C.; ALENCAR, M. M.;
1105 MALHADO, C. H. M. Tendência genética dos efeitos diretos e materno sobre os
1106 pesos à desmama e pós-desmama de bovinos da raça tabapuã. **Revista**
1107 **Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 635-640, 2002.
- 1108
- 1109 FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução**
1110 **Animal**. São Paulo: Livraria Varela, p. 227-256, 2002.
- 1111
- 1112 FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. E.; SOLE, J.M.P. Ovarian
1113 follicular dynamics in Nellore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47,
1114 p.1489-1505, 1997.
- 1115
- 1116 FONTES, P. K.; ERENO, R. L.; PEIXOTO, A. R.; CARVALHO, R. F.; SCARANO,
1117 W. R.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; CASTILHO, A. C. S. Can the antral
1118 follicular count modulate the gene expression of bovine oviducts in Aberdeen
1119 Angus and Nelore heifers?. **Plos One**, v. 13, p. 1-30, 2018.
- 1120
- 1121 FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.;
1122 CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction**
1123 **Science**, v. 124, p. 163-169, 2011.
- 1124
- 1125 FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology**
1126 **of Reproduction**, v.50, p. 225-232, 1994.
- 1127
- 1128 FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator
1129 of reproduction: role in timing puberty. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 205–215, 1999.
- 1130
- 1131 GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; FLUHARTY, F. L.; KINDER, J.
1132 E.; DAY, M. L. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of
1133 luteinizing hormone. **J Anim Sci**. v. 84, p. 3118-3122, 2006.
- 1134
- 1135 GHELLER, J. M.; SILVA, G. C.; SILVA, W. A. L.; SILVA, A. F.; COST
1136 A FILHO, L. C. C.; NOGUEIRA, E.; MELO-STERZA, F. A. Antral follicle count
1137 classification selects fertile heifers without influencing the carcass traits. *Semina:*
1138 **Ciências Agrárias**, v.4, p. 85-96, 2023.
- 1139
- 1140 GIMENES, L. U.; SA, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES, J. R. S.; SOUZA, A.
1141 H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SATORELLI, E. S.; BARROS, C. M.;
1142 CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J. BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and

- 1143 ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers, **Theriogenology**, New York, v. 69. n. 7,
1144 p. 852- 858, 2008.
- 1145 GINTHER, O. J.; BEGM M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of
1146 follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.
1147 78, p. 239-257, 2003.
- 1148
- 1149 GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K.
1150 Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p.
1151 1187-1194, 1996.
- 1152
- 1153 GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Intrafollicular effect of
1154 IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Anim Reprod Sci**, v.105,
1155 p.417-423, 2008.
- 1156
- 1157 GLASS, A.R.; HARRISON, R.; SWERDLOFF, R.S. Effect of undernutrition and
1158 amino acid deficiency on the timing of puberty in rats. **Pediatr. Res.**, v. 10, p. 951-
1159 955, 1976.
- 1160
- 1161 GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1st ed. Cambridge: CAB
1162 International: Raven Press, 1994.
- 1163
- 1164 GOTTSCHALL, C. S. Controle do ciclo estral e taxa de prenhez em matrizes de
1165 corte bovinas: efeitos hormonais, genéticos e ambientais. [Tese]. Porto Alegre:
1166 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2011.
- 1167
- 1168 GREGIANINI, H. A. G.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; NETO, A. P.; COSTA FILHO,
1169 L. C. C.; GREGIANINI, J. T. F.; PINHEIRO, A. K.; TRENKEL, C. K. G.
1170 Precocidade sexual de novilhas Nelore em rebanho sob seleção no Estado do
1171 Acre. **Research, Society and Development**, v. 10, e16310413945, 2021.
- 1172
- 1173 HAN, L.; KON, Y.; PHIZICKY, E.M. Functional importance of Ψ 38 and Ψ 39 in
1174 distinct tRNAs, amplified for tRNAGln(UUG) by unexpected temperature sensitivity
1175 of the s2U modification in yeast. **RNA**. v.21, p. 188-201, 2015.
- 1176
- 1177 HANRIEDER, J.; NYAKAS, A.; NAESSEN, T.; BERGQUIST, J. Proteomic analysis
1178 of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. **J Proteome**
1179 **Res.** v. 7, p. 443-449, 2008.
- 1180
- 1181 HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for
1182 oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p.
1183 819–831, 2012.
- 1184
- 1185 HILLIER, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and
1186 luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction Update**, v.9, p.188-
1187 191, 1994.
- 1188
- 1189 HINEY, I.K.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor-I: a possible
1190 metabolic signal involved in the regulation of female puberty. **Neuroendocrinol.**,
1191 v. 54, p. 420-423, 1991.
- 1192

- 1193 HINEY, J.K.; SRIVASTAVA, V.; NYBERG, C.L.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-
1194 like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of
1195 female puberty. **Endocrinol.**, v. 137, p. 3717-3728, 1996
1196
- 1197 HINEY, J.K.; SRIVASTAVA, V.; NYBERG, C.L.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-
1198 like growth factor of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of
1199 female puberty. **Endocrinology**, v.137, p.3717-3728, 1996.
1200
- 1201 HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary.
1202 **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.
1203
- 1204 HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN
1205 DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal
1206 bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.
1207
- 1208 IRELAND, J. J.; ZIELAK, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.;
1209 BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.;
1210 SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve
1211 is linked to alterations in intrafollicular o estradiol production and ovarian
1212 biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of**
1213 **Reproduction**, v. 80, p. 954–964, 2009.
1214
- 1215 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
1216 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.;
1217 IRELAND, J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically
1218 healthy oocytes and follicles in ovaries of Young adult cattle. **Biology of**
1219 **Reproduction**, v. 79, p. 1219-1225, 2008.
1220
- 1221 IRELAND, J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.
1222 W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable
1223 within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and
1224 the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human**
1225 **Reproduction**, v. 22, p. 1687-1695, 2007.
1226
- 1227 IRELAND, J.J., SMITH, G.W., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER,
1228 J.K., IRELAND, J.L., MOSSA, F., LONERGAN, P., EVANS, A.C. Does size matter
1229 in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve
1230 on ovarian function and fertility, utility of anti-mullerian hormone as a diagnostic
1231 marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle.
1232 **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 1–14, 2011.
1233
- 1234 JARKOVSKA, K.; MARTINKOVA, J.; LISKOVA, L.; HALADA, P.; MOOS, J.;
1235 REZABEK, K.; GADHER, S. J.; KOVAROVA, H. Proteome mining of human
1236 follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological
1237 pathways in women undergoing in vitro fertilization. **J Proteome Res.** v. 9, p.
1238 1289-1301, 2010.
1239
- 1240 JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU,
1241 X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that
1242 high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact

- 1243 on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of**
1244 **Reproduction**, v. 80, p. 1272-1281, 2009.
- 1245
- 1246 KANEMATSU, T.; IRAHARA, M.; MIYAKE, T.; SHITSUKAWA, K.; AONO, T. Effect
1247 of insulin like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-
1248 pituitary axis in vitro. **Acta endocrinol.**, v. 125, p. 227-233, 1991.
- 1249
- 1250 KATZ-JAFFE, M. G.; MCCALLIE, B. R.; PREIS, K. A.; FILIPOVITS, J.;
1251 GARDNER, D. K. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII
1252 oocytes. **Theriogenology**, v. 71, p. 939-946, 2009.
- 1253
- 1254 KAWASHIMA, C.; FUKIHARA, S.; MAEDA, M.; KANEKO, E.; MONTOYA, C.A.;
1255 MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MATSUNAGA, N.; KIDA, K.; MIYAKE, Y.I.; SCHAMS,
1256 D.; MIYAMOTO, A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of
1257 dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy
1258 cows. **Reproduction**, v.133, n.1, p.155-163, 2007.
- 1259
- 1260 KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of
1261 undernutrition on reproduction. **J.Anim.Sci.**, v. 74, p. 1-17, 1996.
- 1262
- 1263 KOYAMA, K.; KOYAMA, T.; SUGIMOTO, M. Repeatability of antral follicle count
1264 according parity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**,
1265 v.64, p. 5395-539, 2018.
- 1266
- 1267 KUSHNIR, M. M.; NAESSEN, T.; WANGGREN, K.; ROCKWOOD, A. L.;
1268 CROCKETT, D. K.; BERGQUIST, J. Protein and steroid profiles in follicular fluid
1269 after ovarian hyperstimulation as potential biomarkers of IVF outcome. **J**
1270 **Proteome Res.** v. 11, p. 5090-5100, 2012.
- 1271
- 1272 LAMB, G. C.; DAHLEN, C. R.; LARSON, J. R.; MARQUEZINI, G.; STEVENSON,
1273 J. S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial
1274 insemination in beef cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 181-
1275 192, 2010.
- 1276
- 1277 LEHMKUHL, R.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.; BARBIERI, D.; MACHADO, M.;
1278 RUBIN, M.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido
1279 folicular. **Ars Vet.** v. 18, p. 273-279, 2002.
- 1280
- 1281 LIMA, M.A.; MOROTTI, F.; BAYEUX, B.M.; REZENDE, R.G.; BOTIGELLI, R.C.;
1282 BEM, T.H.C.; FONTES, P.K.; NOGUEIRA, M.F.G.; MEIRELLES, F.V.;
1283 BARUSELLI, P.S.; SILVEIRA, J.C.; PERECIN, F.; SENEDA, M.M Ovarian
1284 follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and
1285 transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle
1286 count. **Sci Rep**, v. 10, 19557, 2020.
- 1287
- 1288 LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios
1289 esteróides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35,
1290 p. 472-482, 2011.
- 1291

- 1292 LLEWELLYN, S.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D.A.; MURPHY, J.J.;
1293 SCARAMUZZI, R.J.; WATHES, D.C. Effect of negative energy balance on the
1294 insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of postpartum
1295 dairy cows. **Reproduction**, v.33, n.3, p.627-639, 2007
1296
- 1297 LOUREIRO, B.; ERENO, R. L.; FAVORETO, M. G.; BARROS, C. M. Expression of
1298 androgen-producing enzyme genes and testosterone concentration in Angus and
1299 Nelore heifers with high and low ovarian follicle count. **Theriogenology**, v. 86, p.
1300 523–527, 2016.
1301
- 1302 LUCCI, C.M.; SILVA, R.V. CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÃO, N. Light
1303 microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small**
1304 **Ruminant Research**, North Carolina, v. 41, p. 61-69, 2001.
1305
- 1306 MAGALHÃES, D.M.; SALES, E.T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T.F.P.; TONIOLI, R.;
1307 FIGUEIREDO, J.R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento
1308 semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in
1309 vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.32-38,
1310 2012.
1311
- 1312 MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; COOK, B.; OLSON, W. O.;
1313 MAPLETOFT, R. J. (2002). The use of progestins in regimens for fixed-time
1314 artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 1049-1059, 2002.
1315
- 1316 MARTINEZ, M. F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.;
1317 JUENGEL, J. L. Association between antral follicle count and reproductive
1318 measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based
1319 production system. **Theriogenology**, v. 85, p. 466-475, 2016.
1320
- 1321 MCNATTY, K. P. Cycle changes in antral fluid hormone concentrations in
1322 humans. **Clin Endocrinol Metab.** v. 7, p. 577-600, 1978.
1323
- 1324 MENDONÇA, H. G. R.; SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS,
1325 T. R. R.; BLASCHI, W.; MOROTTI, F.; MORAES, F. L. Z.; SENEDA, M. M.
1326 Pregnancy rates following FTAI of Nelore heifers (*Bos indicus*) with high,
1327 intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**. v. 10,
1328 p.452, 2013.
1329
- 1330 MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle
1331 development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 217–237, 2003.
1332 MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: a review. **Anim**
1333 **Reprod Sci.** v. 18, p. 167-182, 1989.
1334
- 1335 MOROTTI, F.; BARREIROS, T. R. R.; MACHADO, F. A.; GONZÁLEZ, S. M.;
1336 MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. IS the number of antral follicle an interesting
1337 selection criterium for fertility in cattle?. **Animal Reproduction**, v. 12, p. 479-486,
1338 2015.
1339
- 1340 MOROTTI, F.; MORETTI, R.; SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.;
1341 CERQUEIRA, P. H. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and

- 1342 conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjects to
1343 timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 170-177,
1344 2018.
- 1345
1346 MOROTTI, F.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; SILVA-SANTOS, K. C.;
1347 ROSO, V. M.; SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and
1348 antral follicle population in beef heifers. **Theriogenology**, v. 15, n. 91, p. 21-26,
1349 2017.
- 1350
1351 MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B.
1352 Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature**
1353 **Methods**, v.5, p. 621-628, 2008.
- 1354
1355 MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, S. T.; BERRY, D. P.;
1356 CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O.
1357 Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility
1358 in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2355-2361, 2012.
- 1359
1360 NAGAI, K.; YANAGAWA, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. The relationship
1361 between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of
1362 in vitro-grown oocytes derived early antral follicles. **Biomedical Research**, v. 37,
1363 p. 63-71, 2016.
- 1364
1365 NAGAI, K.; YANAGAWAA, Y.; KATAGIRIA, S.; NAGANOA, M. Fertilizability of
1366 oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in
1367 ovaries. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 172–178, 2015.
- 1368
1369 NAKADA, K.; ISHIKAWA, Y.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Changes in responses
1370 to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in
1371 prepubertal heifers. **J. Reprod. Dev.**, v. 48, p. 545-551, 2002.
- 1372
1373 NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes
1374 in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone,
1375 luteinizing hormone, estradiol-17 β , testosterone, progesterone, and inhibin in
1376 heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 57-69,
1377 2000.
- 1378
1379 NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; SALES, A.; VIANA, J. H. M. Correlação
1380 morfológica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos.
1381 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2003, v. 40, n.
1382 2, p. 126-132.
- 1383
1384 NOGUEIRA, M. F. G.; FERNANDES, P.; ERENO, R. L.; SIMÕES, R. A. L.;
1385 BURATINI JUNIOR, J.; BARROS, C. M. Luteinizing Hormone Receptor (LHR):
1386 basic concepts in cattle and other mammals. A review. **Anim. Reprod**, v.7, p.51-
1387 64, 2010.
- 1388
1389 OLIVEIRA JUNIOR, G. A.; PINHEIRO, V. G.; FONSECA, P. A. S.; COSTA, C. B.;
1390 PIOLTINE, E. M.; BOTIGELLI, R. C.; RAZZA, E. M.; ERENO, R. L.; FERRAZ, J. B.
1391 S.; SENEDA, M. M.; NOGUEIRA, M. F. F. Genomic and phenotypic analyses of

- 1392 antral follicle count in Aberdeen Angus cows. *Livestock Science*. v.249, p. 1-7,
1393 2021
- 1394
- 1395 OLIVEIRA JUNIOR, J. S.; CARDOSO, C. J. T.; SILVA, W. A. L.; KISCHEL, H.;
1396 SOUZA, M. B.; ANDRADE, E. R.; NOGUEIRA, E.; SILVA-SANTOS, K. C.;
1397 SENEDA, M. M.; MELO-STERZA, F. A. Antral follicles population in heifers and
1398 cows of Nelore and Girolando breeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p.
1399 3741-3750, 2015.
- 1400
- 1401 PAO, C.I.; FARMER, P.K.; BEGOVIC, S.; VILLAFUERTE, B.C.; WU, G.;
1402 ROBERTSON, D.G.; PHILLIPS, L.S. Regulation of Insulin-Like Growth Factor-I
1403 (IGF-I) and IGF-Binding Protein 1 Gene Transcription by Hormones and Provision
1404 of Amino Acids in Rat Hepatocytes. **Mol. Endo.**, v. 7, p. 1561-1568, 1993.
- 1405
- 1406 PATTERSON, D.J.; PERRY, R.C.; KIRACOFE, G.H.; BELLOWS, R.A.;
1407 STAIGMILLER, R.B.; CORAH, L.R. Management considerations in heifer
1408 development and puberty. **J.Anim.Sci.**, v. 70, p. 4018-4035, 1992.
- 1409
- 1410 PFEIFER, L. F. M.; LEAL, S. D. C. B. D. S.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.;
1411 CORRÊA, M. N. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone
1412 concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows.
1413 **R. Bras. Zootec.** v, 41, p. 1004–1008, 2012.
- 1414
- 1415 PFEIFER, L. F. M; OLIVEIRA JUNIOR, J. S.; SENEDA, M. M.; MOROTTI, F.;
1416 ANDRADE, E. R.; MOREIRA, E. M.; ANDRADE, J. S.; SILVA, G. M; PORTO, M.
1417 O.; CAVALI, J. Puberty and parturition on the antral follicle count of female Nelore
1418 beef cattle. **Pesq. agropec. bras.**, v.58, e03140 2023.
- 1419
- 1420 PONTES, J. H. F.; MELO-STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.;
1421 SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo
1422 production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using
1423 Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640–1646, 2011.
- 1424
- 1425 PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C.
1426 R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H.
1427 S.; FAIFER, F. S.; MELO-STERZA, F. A.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-
1428 scale In vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos*
1429 *indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74,
1430 p.1349–1355, 2010.
- 1431
- 1432 QUIRK, SM.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.L.; PORTER, D.A. Ovarian
1433 follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and
1434 survival. **J Anim Sci**, v.82, p.40-52, 2004.
- 1435
- 1436 RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKIA, P. M.
1437 Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and
1438 goats. **Anim Reprod Sci**. v. 78, p. 259-270, 2003.
- 1439
- 1440 READER, K. L.; STANTON, J. L.; JUENGEL, J. L. The role of oocyte organelles in
1441 determining developmental competence. **Biology (Basel)**. v. 6, p. 35, 2017.

- 1442 REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. São Paulo, SP: Roca Ltda,
1443 1996, 856p.
1444
- 1445 REVELLI, A.; PIANE, L.D.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.;
1446 RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical
1447 markers to metabolomics. **Reproductive biology and endocrinology**, v.7, p.
1448 4330-4337, 2009.
1449
- 1450 RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J.; MORGAN, G.L. Nutritional
1451 anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum LH and
1452 IGF-I. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 961-966, 1991.
1453
- 1454 ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis - A symposium in
1455 perspective. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.19-27, 1996.
1456
- 1457 ROSA, C. O.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, P. R. A.; CESARO, M. P.;
1458 LUNARDELLI, P. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; BASSO, A. C.; BORDIGON, V.;
1459 SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and
1460 oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles.
1461 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 921-929, 2018.
1462
- 1463 ROY, S. K. ; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral
1464 follicles. **Fertil. Steril.** v. 59, p. 783-790. 1993.
1465
- 1466 RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92,
1467 1983.
1468
- 1469 MAMO, S.; MEHTA, J. P.; MCGETTIGAN, P.; FAIR, T.; SPENCER, T. E.; BAZER,
1470 F. W.; LONERGAN, P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine
1471 conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation
1472 **Biol. Reprod**, v.85, p. 1143-1151, 2011
1473
- 1474 SA FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E.; PERRY, G. A.;
1475 BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous
1476 response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous
1477 synchronization with progesterone or progestin based protocols in suckled *Bos*
1478 *indicus* cows. **Anim. Reprod. Sci.** v. 120, p. 23–30, 2010.
1479
- 1480 SADEU, J. C.; CORTVRINDT, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and
1481 ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue.
1482 **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, 2006.
1483
- 1484 SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.;
1485 SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High
1486 numbers of antral follicle are positively associated with *in vitro* embryo production
1487 but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction**
1488 **Science**, v. 165, p. 17-21, 2016.
1489

- 1490 SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.;
1491 BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore
1492 (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.
1493
- 1494 SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R.
1495 L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive
1496 management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Soc**
1497 **Reprod Fertil**. v. 67, p. 357-375, 2010.
1498
- 1499 SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**,
1500 v.157, p.29-38, 1981.
1501
- 1502 SCHILLO, K.K. 'Oestrus Cycles', 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences. San
1503 Diego, CA: Academic Press.
1504
- 1505 SCHILLO, K.K.; HALL, J.B., HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the
1506 onset of puberty in the beef heifer. **J Anim Sci**, v.70, p.3994-4005, 1992.
1507
- 1508 SCHWEIGERT, F. J.; GERICKE, B.; WOLFRAM, W.; KAISERS, U.;
1509 DUDENHAUSEN, J. W. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of
1510 women undergoing IVF. **Hum Reprod**. v.21, p. 2960-2968, 2006.
1511
- 1512 SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R.
1513 Ovarian and uterine morphology and function in angus and brahman cows.
1514 **Journal of Animal Science**, v. 59, 1026-1046, 1984.
1515
- 1516 SEMMELMANN, C.E.N.; LOBATO, J.F.P.; ROCHA, M.G. Efeito de Sistemas de
1517 Alimentação no Ganho de Peso e Desempenho Reprodutivo de Novilhas Nelore
1518 Acasaladas aos 17/18 Meses. **Rev. bras. zootec.**, v. 30, nº3, p. 835-843, 2001.
1519
- 1520 SENEDA, M. M.; MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; SANCHES,
1521 T. K.; BLASCHI, W.; BARREIROS, T. R. R. Antral follicle population in prepubertal
1522 and pubertal heifers. **Reprod. Fertil. Dev**. v. 31, p. 10–16, 2019.
1523
- 1524 SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A. Relationships among weight gains, age at puberty
1525 and reproductive performance in heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 32, p. 127–131, 1971.
1526
- 1527 SILVA, E. J.; CAMPOS, M. D. S. M.; NASCIMENTO, P. S.; MACIEL, J. P. O.;
1528 MELO, E. V. M.; CHAVES, M. S.; BARTOLOMEU, C. C. Estudo dos índices de
1529 desempenho Reprodutivo de bovinos de três propriedades situadas no Agreste e
1530 Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **Scientia Plena**. v. 11, p. 1–4, 2015.
1531
- 1532 SILVA, F. M. B.; LOPES, D. T.; FERRAZ, H. T.; VIU, M. A. O.; RAMOS, D. G. S.;
1533 SATURNINO, K. C.; FONTANA, C. A. P.; SILVA, J. M. A.; LESO, F. V. Estratégias
1534 para antecipação da puberdade em novilhas *Bos taurus indicus* pré-púberes.
1535 **PUBVET**, v. 12, p. 136, 2018.
1536
- 1537 SILVA, M. D.; BARCELLOS, J. O. J.; PRATES, E. R. Desempenho reprodutivo de
1538 novilhas de corte acasaladas aos 18 ou aos 24 meses de idade. **Rev Bras**
1539 **Zootec**. v. 34, p. 2057-2063, 2005.

- 1540
1541 SILVA-SANTOS, K. C. F.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.;
1542 ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURION, L.; STERZA, F. A. M.; SENEDA, M.
1543 M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos Taurus*
1544 *indicus* and *Bos Taurus taurus* females. **Theriogenology**, v. 76, p. 1051-1057,
1545 2011.
- 1546
1547 SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTT, F.;
1548 SILOTO, S. L.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA,
1549 D. C. M.; SENEDA, M. M. Antral follicle population and embryo production – *in*
1550 *vitro* and *in vivo* – of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages.
1551 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 228-232, 2014.
- 1552
1553 SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A.,
1554 McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep
1555 fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the FecB gene. **Journal of**
1556 **Reproduction and Fertility**, v.98, p.41-54, 1994.
- 1557
1558 SNELLING, W. M.; CUSHMAN, R. A.; FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.;
1559 BENNET, G. L.; KEELE, J. W.; KUEHN, L. A.; MCDANELD, T.G.; THALLMAN, R.
1560 M.; THOMAS, M. G. How single nucleotide polymorphism chips will advance our
1561 knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef
1562 females. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1152-1165, 2012.
- 1563
1564 SOLDANI, R.; CAGNACCI, A.; PAOLETTI, A.M.; YEN, S.S.C.; MELIS, G.B.
1565 Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-
1566 releasing hormone by insulin like growth factor I *in vitro* . **Fertil. Steril.**, v. 64, p.
1567 634-637, 1995.
- 1568
1569 STOJSIN-CARTER, A.; MAHBOUBI, K.; COSTA, N. N.; GILLIS, D. J.; CARTER,
1570 T. F.; NEAL, M. S.; MIRANDA, M. S.; OHASHI, O. M.; FAVETTA, L. A.; KING, W.
1571 A. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences in the
1572 reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Animal Reproduction**
1573 **Science**, v.167, p. 51–58, 2016.
- 1574
1575 SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND,
1576 J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of
1577 heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.547-555, 1994.
- 1578
1579 TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA,
1580 H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.;
1581 MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Oxidative stress
1582 impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage
1583 and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v.44, p. 280–287,
1584 2008.
- 1585
1586 THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation
1587 of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.**, v. 15, p. 80–101, 1994.
- 1588

- 1589 THOMAS, M.G.; CARROLL, J.A.; RAYMOND, S.R.; MATTERI, R.L.; KEISLER,
1590 D.H. Transcriptional regulation of pituitary synthesis and secretion of growth
1591 hormone in growing wethers and the influence of zeranol on these mechanisms.
1592 **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 1, p. 309-324, 2000.
- 1593
1594 VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and in vitro
1595 development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.
- 1596
1597 VAZ, R.Z.; LOBATO, J.F.P. Efeito da idade de desmame no desempenho
1598 reprodutivo de novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de
1599 idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.142-150, 2010.
- 1600
1601 VELAZQUEZ, M.A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The
1602 role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated
1603 donors. **Reproduction**, v.137, p.161-180, 2009.
- 1604
1605 WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M. J.; MCAULIFFE, F. M.; WINGFIELD,
1606 M.; BRENNAN L. An investigation into the relationship between the metabolic
1607 profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome.
1608 **Fertil Steril**. v. 97, p. 1078-1784, 2012.
- 1609
1610 WALSH, S. W.; MOSSA, R.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; SCHEETZ, D.;
1611 JIMENEZ-KRASSEL, F.; TEMPELMAN, R. J.; CARTER, F.; LONERGAN, P.;
1612 EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Heritability and impact of environmental effects
1613 during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.
1614 97, 1-9, 2014.
- 1615
1616 WALTERS, K.A.; BINNIE, J.P.; CAMPBELL, B.K.; ARMSTRONG, D.G.; TELFER,
1617 E.E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression
1618 are dose and stage dependent. **Reproduction**, v.131, p.515-523, 2006.
- 1619
1620 WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for
1621 transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v.10, 57-63 , 2009.
- 1622
1623 WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of
1624 follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal
1625 Science**, v.82, p.63-74, 2004.
- 1626
1627 YANG, J.; ZHANG, Y.; XU, X.; LI, J.; YUAN, F.; BO, S.; QIAO, J.; XIA, G.; SU, Y.;
1628 ZHANG, M. Transforming growth factor- β is involved in maintaining oocyte meiotic
1629 arrest by promoting natriuretic peptide type C expression in mouse granulosa
1630 cells. **Cell Death Dis**. v.10, p.558, 2019.
- 1631
1632 ZHOU, J.; ADESANYA, O.O.; VATZIAS, G.; HAMMOND, J.M.; BONDY, C.A.
1633 Selective expression of insulin-like growth factor system components during
1634 porcine ovary follicular selection. **Endocrinology**, v.137, p.4893-4901, 1996.

1635 **CAPÍTULO 2**

1636

1637 Artigo 1 - Novilhas Nelore x Angus com baixa CFA expressam mais genes ligados
1638 a infertilidade do que aquelas com alta CFA

1639

1640 GHELLER, Janaina Menegazzo, MELO-STERZA, Fabiana de Andrade

1641

1642 Resumo

1643 O objetivo foi avaliar a eficiência reprodutiva a IATF, conhecer as
1644 características de carcaça e dos ovários, bem como o perfil de expressão gênica
1645 de oócitos de novilhas cruzadas Nelore x Angus, com diferentes CFAs. Foram
1646 utilizadas 140 novilhas, com idade média $10 \pm 0,54$ meses, peso $295,1 \pm 32,6$ kg e
1647 ECC $3,44 \pm 0,41$, mantidas em sistema de confinamento. As fêmeas receberam
1648 protocolo de pré-sincronização com 150 mg de progesterona injetável (Sincrogest
1649 ®, Ourofino, São Paulo, Brasil) no D-24, e no D-12 1 mg de cipionato de estradiol
1650 (ECP® Zoetis, São Paulo, Brasil). No D0 receberam 2 mg de benzoato de
1651 estradiol (Gonadiol®, Sintex AS, Argentina) e um dispositivo intravaginal com 0,5
1652 g de progesterona (DIB 0,5®, Sintex AS, Argentina). No D8, retirou-se dispositivo
1653 intravaginal e receberam 12,5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis,
1654 São Paulo, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (ECP® Zoetis, São Paulo,
1655 Brasil) e 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina). No D10
1656 foi realizada a IA, e 30 dias após o diagnóstico de gestação. Foi realizado exame
1657 ultrassonográfico dos ovários no D0 e D10, e ultrassonografia de carcaça no D0.
1658 As novilhas não gestantes foram abatidas e seus ovários foram coletados para
1659 verificação da morfologia, e os COCs foram classificados conforme sua qualidade.

1660 Foi realizado RNA-seq a partir de oócitos de fêmeas com alta e baixa CFA. A
1661 média da CFA foi $22,7 \pm 8,5$ folículos, e os grupos de baixa, média e alta CFA
1662 continham respectivamente, ≤ 14 , 15 a 30 e ≥ 31 folículos. A taxa de concepção
1663 média foi de 55%, sendo 42,2%, 57,7% e 57,1% para baixa, média e alta, e não
1664 diferiu entre os grupos, bem como não houve diferença na avaliação de carcaça,
1665 dos ovários no D0 e D10, e nas estruturas encontradas nos ovários *post mortem*
1666 ($P > 0,05$), exceto para o diâmetro do ovário, que foi maior no grupo alta CFA
1667 ($P = 0,0437$). Foram identificados 32 DEGs (*Differentially expressed genes*) entre
1668 os grupos baixa e alta CFA, sendo 30 *up regulated*, e 2 *down regulated* no grupo
1669 de baixa CFA. Dentre os genes diferentemente expressos, 22% têm relação com
1670 a fertilidade (CAB39, SLC2A6, CITED2, FDX1, HSD11B2, CD81 e Pla2g12b). A
1671 CFA não interferiu sobre a taxa de prenhez, no entanto novilhas Nelore x Angus
1672 com baixa CFA apresentaram regulação positiva de genes contrários a fertilidade,
1673 por isso selecionar animais com maior CFA como doadoras de oócitos, para
1674 produzir maior número de embriões, não representa risco à fertilidade e produção
1675 de carne.

1676

1677 Palavras-chave: fertilidade; população de folículos antrais; IATF; oócitos; RNA-
1678 seq.

1679

1680 **1. Introdução**

1681 A relação entre a contagem de folículos antrais (CFA) e a fertilidade em
1682 bovinos tem sido o foco de diversos estudos ao longo dos anos (Burns et al.,
1683 2005; Ireland et al., 2008; Evans et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014; Oliveira
1684 Junior et al., 2015; Santos et al., 2016; Morotti et al., 2018; Lima et al., 2020;

1685 Gheller et al., 2023). A CFA é uma característica altamente variável entre as
1686 fêmeas, no entanto é constante durante a vida dos animais (Burns et al., 2005;
1687 Ireland et al., 2007) independente da raça, idade, fase do ciclo estral (Burns et al.,
1688 2005). Dessa forma, é possível conhecer a CFA de uma fêmea através de um
1689 único exame ultrassonográfico e classificá-la de acordo com o número de folículos
1690 encontrados (Ireland et al., 2007; Silva-Santos et al., 2014). A facilidade de
1691 aplicação dessa técnica de avaliação coloca a CFA como um potencial marcador
1692 para fertilidade em bovinos.

1693 Para fêmeas *Bos taurus* foi encontrada relação positiva da alta CFA com a
1694 fertilidade (Mossa et al., 2012; Ireland et al., 2007; Martinez et al., 2016; Oliveira
1695 Junior et al., 2021) e pior desempenho reprodutivo de fêmeas com baixa CFA
1696 (Ireland et al., 2008; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012; Martinez et al., 2016).

1697 Para animais cruzados já foi relatado que a CFA influencia positivamente a
1698 taxa de prenhez em vacas Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*) (Garcia et al.,
1699 2020), enquanto para fêmeas Braford não houve melhora do desempenho
1700 reprodutivo associada a alta CFA, porém uma maior taxa de crescimento folicular
1701 e maiores diâmetros foliculares foram descritos nessas fêmeas com baixa CFA
1702 (Santos et al, 2012). Embora animais oriundos do cruzamento Nelore (*Bos*
1703 *indicus*) e Angus (*Bos taurus*) estejam presentes em grande parte do território
1704 brasileiro e apresentem grande importância visto a sua adaptabilidade para
1705 produzir carne sob as condições adversas como alta temperatura, parasitas e
1706 pastagens pobres (Oliveira et al., 2022) não são encontrados dados na literatura
1707 que relacionem a CFA com a fertilidade de fêmeas para esse cruzamento.

1708 Identificar fêmeas férteis o mais cedo possível dentro dos rebanhos é uma
1709 estratégia interessante quando o objetivo é melhorar essa característica mais

1710 rapidamente. Nesse sentido, a ferramenta mais utilizada para identificação das
1711 fêmeas precoces baseia-se na exposição das novilhas jovens à reprodução (IA,
1712 IATF ou monta natural) (Vozzi, 2008; Gregianini et al., 2021). No entanto, por
1713 motivos econômicos e de bem-estar animal, seria ideal que as fêmeas pudessem
1714 ser identificadas quanto a fertilidade antes mesmo de serem submetidas a
1715 reprodução.

1716 O objetivo desse estudo foi avaliar a CFA de fêmeas F1 Nelore X Angus e
1717 a relação dessa característica com eficiência reprodutiva, analisando o resultado
1718 a IATF, bem como conhecer o perfil da expressão gênica de oócitos oriundos de
1719 fêmeas com baixa e alta CFA, a fim de identificar genes diferentemente expressos
1720 que justifiquem melhor ou pior desempenho e amparem as escolhas pelos
1721 animais mais férteis nos programas reprodutivos

1722

1723 **2. Material e métodos**

1724

1725 O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas da COMISSÃO
1726 DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
1727 MATO GROSSO DO SUL/UFMS, de acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro
1728 de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, aprovado sob o número
1729 1.077/2019 e pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade
1730 Estadual de Mato Grosso do Sul sob o nº 006/2021.

1731

1732 **3.1 Local e animais**

1733 O experimento foi realizado na Agropecuária Cedron, localizada no
1734 município de Anastácio no Mato Grosso do Sul (-20°30'04.08"S 55°53'34.13"O).

1735 Foram utilizadas 140 novilhas ($\frac{1}{2}$ Angus x $\frac{1}{2}$ Nelore), com idade média de
1736 10 \pm 0,54 meses, peso médio de 295,1 \pm 32,6 kg e escore de condição corporal
1737 (ECC) médio de 3,44 \pm 0,41, considerando a escala de 1 a 5 de acordo com
1738 Lowman et al. (1976). Todas as novilhas nasceram na propriedade e foram
1739 desmamadas ao mesmo tempo, permanecendo 30 dias após o desmame em
1740 sistema extensivo. Após esse período foram mantidas em sistema de
1741 confinamento recebendo uma dieta com relação concentrado:volumoso de 70:30,
1742 à base de: milho, farelo de soja, casquinha de soja, núcleo e silagem de capim,
1743 contendo: 16% de proteína bruta, 2% de extrato etéreo, 4% de matéria mineral e
1744 48% de fibra em detergente neutro.

1745

1746 3.2 Protocolo de IATF

1747 Todas as fêmeas foram submetidas a um protocolo hormonal de pré-
1748 sincronização do ciclo estral, caracterizado pela administração de progesterona
1749 injetável intramuscular (IM) (150 mg de Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brasil)
1750 em um dia aleatório do ciclo estral, 24 dias antes (D-24) do início do protocolo de
1751 IATF, seguido de 1 mg de cipionato de estradiol (ECP® Zoetis, São Paulo, Brasil)
1752 após 12 dias, ou seja, no D-12.

1753 No D0 procedeu-se a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE)
1754 (Gonadiol®, Sintex AS, Argentina) i.m. e a inserção de um dispositivo intravaginal
1755 com 0,5 g de progesterona (P4) (DIB 0,5®, Sintex AS, Argentina).

1756 No D8, o dispositivo de P4 foi removido e as fêmeas receberam 12,5 mg de
1757 dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil), 1 mg de cipionato
1758 de estradiol (CE) (ECP® Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina
1759 coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina), todos via

1760 i.m. No D10 foi realizada a IATF com sêmen de um único touro da raça Brangus e
1761 uma única partida de fertilidade testada, para retirar o efeito do touro do
1762 experimento.

1763 Trinta dias após a IATF (DG30) foi realizado o diagnóstico de gestação por
1764 ultrassonografia transretal, com equipamento de ultrassom (SonoScape® A5
1765 VET) acoplado a um transdutor linear de 5,0 MHz.

1766 Calculou-se a taxa de concepção (TC), pela fórmula: $TC = n^{\circ} \text{ de novilhas}$
1767 $\text{prenhes} / n^{\circ} \text{ de novilhas inseminadas} \times 100$.

1768

1769 3.3 Ultrassonografia de ovário e CFA

1770 As avaliações ovarianas foram realizadas utilizando equipamento de
1771 ultrassom (SonoScape® A5 VET) acoplado a um transdutor linear de 5,0-MHz. A
1772 atividade ovariana foi verificada em dois momentos, no D0 e no D10, nos quais
1773 foram avaliados os dois ovários de cada fêmea para identificar a presença e o
1774 diâmetro do corpo lúteo (CL) e do folículo dominante (FD), quando $>8\text{cm}$. A
1775 medida do diâmetro do FD (DFD) e do CL (DCL) foi obtida considerando a maior
1776 distância entre dois pontos da estrutura. Para tanto foram utilizadas as
1777 ferramentas de análise de imagens do próprio aparelho.

1778 Para determinar a CFA foi realizada avaliação de um único ovário de cada
1779 fêmea, no D0 do protocolo de IATF, uma vez que já foi comprovado que as CFAs
1780 dos dois ovários são equivalentes entre si (Oliveira Junior et al., 2015; Gheller et
1781 al., 2023). Portanto, um ovário de cada fêmea foi avaliado para visualização de
1782 todos os folículos antrais $\geq 3\text{mm}$, conforme descrito por Cardoso et al. (2018). Para
1783 contar os folículos, o operador realizava uma rotação lenta de 180° para garantir

1784 que todos os folículos fossem contados uma vez. A CFA de cada animal foi
1785 determinada pela multiplicação do número encontrado por duas vezes.

1786 Os grupos de CFA foram divididos em baixa, média e alta, considerando a
1787 média \pm 1 desvio padrão. Dessa forma, o grupo com baixa CFA apresentou \leq 14
1788 de folículos (n=29), média CFA entre 15 e 30 (n=90), e o grupo de alta CFA
1789 apresentou número \geq 31 folículos (n=21).

1790

1791 3.4 Ultrassonografia de carcaça

1792 Para acompanhamento das características da carcaça os animais foram
1793 submetidos a ultrassonografia (USSC). As imagens foram coletadas com o auxílio
1794 de um ultrassom (KAIXIN®), com transdutor linear de 17 cm e frequência de 3,5
1795 Mhz e imagens bi-dimensionais em modo-B. Para a área de olho de lombo (AOL)
1796 e a espessura de gordura (EG) a coleta foi medida no espaço intercostal entre a
1797 12a e 13a costela. As imagens da espessura de gordura na garupa (EGP) foram
1798 coletadas entre os ossos ílio e ísquio na intersecção dos músculos *Gluteus*
1799 *medius* e *Biceps femoris*. Para melhor nitidez das imagens foi utilizado óleo
1800 vegetal como condutor. As medidas foram realizadas nos manejos do dia do início
1801 do protocolo de IATF (D0).

1802

1803 3.5 Coleta de oócitos

1804 Foram coletados os ovários de 24 fêmeas, avaliadas como não gestantes
1805 no DG30, durante o abate em frigorífico local. Nessa etapa foram utilizadas
1806 apenas fêmeas com baixa e alta CFA.

1807 As fêmeas foram reconhecidas pelo brinco de identificação na pendura dos
1808 animais imediatamente após a sangria, enquanto uma equipe aguardava as

1809 carcaças na linha de abate. Os pares de ovários de cada fêmea foram coletados
1810 individualmente após a evisceração, e alocados em pacotes devidamente
1811 identificados, confeccionados com material permeável (tecido não-tecido:TNT). Os
1812 pacotes foram alocados em recipiente isotérmico contendo solução fisiológica a
1813 35°C até serem direcionados para o laboratório. No laboratório foi realizada a
1814 verificação da morfologia ovariana ao mensurar diâmetro dos ovários, número de
1815 folículos, diâmetro de folículos dominantes, diâmetro de corpo lúteo. A aspiração
1816 dos folículos pequenos e folículos dominantes foram realizadas com auxílio de
1817 agulha 25x0,8 acoplada a seringa de 3 mL. Os produtos oriundos da aspiração
1818 (fluido folicular e COCs) de cada par de ovário foi depositado em placa de petri
1819 para seleção e classificação de acordo com a morfologia.

1820 Os COCs foram classificados conforme sua qualidade em grau I, II, III, IV,
1821 desnudo, expandido e degenerado (Stojovic et al., 2001) e apenas os COCs
1822 classificados como grau I e II foram utilizados na análise de RNA-seq. Após a
1823 classificação esses foram transferidos para uma gota de DPBS livre de Ca e Mg
1824 (D8537, Sigma-Aldrich®) e lavados 3 vezes na mesma solução. Os COCs foram
1825 desnudados por pipetagem com pipeta ajustada para 60 µl. Somente os oócitos
1826 completamente desnudos foram utilizados. Após esse procedimento, foram
1827 armazenados pools de 5 oócitos em um total de 5µL em cada eppendorf
1828 RNAase/DNAsefree. Imediatamente após o processamento as amostras foram
1829 congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente foram armazenadas em
1830 freezer -80°C até o momento da realização das análises.

1831 O fluido folicular restante da placa de petri foi acondicionado em eppendorf
1832 de 2 mL, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido

1833 e novamente alocado em eppendorf, sendo congelado em nitrogênio líquido e
1834 transferido para o freezer -80°C até o momento da realização das análises.

1835

1836 3.6 Extração de RNA e sequenciamento

1837 Três pools de cada grupo (baixa e alta CFA) contendo 10 oócitos
1838 provenientes de 6 animais, foram avaliados quanto as diferenças transcriptômicas
1839 com base na análise de sequenciamento de RNA (RNAseq). Para este objetivo, o
1840 RNA total foi extraído usando o Kit de Isolamento de RNA PicoPure (Cat. #
1841 KIT0204; ThermoFisher Scientific), tratado com DNase livre de RNase (Qiagen,
1842 Hilden, Renânia-Vestfália, Alemanha) e ressuspenso em 7 mL do Tampão de
1843 Eluição (acompanhando o kit de isolamento de RNA PicoPure). A integridade e as
1844 quantidades de RNA foram avaliadas através do kit RNA 6000 Pico e do 2100
1845 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O kit SMART-Seq HT
1846 foi usado para síntese e amplificação de cDNA (Takara Bio Inc, Kusatsu, Kansai,
1847 Japão) a partir de 0,2 ng de RNA total, e as bibliotecas foram preparadas usando
1848 o Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA). O
1849 sequenciamento foi realizado no NextSeq 2000 (Illumina) considerando leituras de
1850 pares de 100 pb. As leituras de RNAseq foram mapeadas para o genoma de
1851 referência de bovinos usando o alinhador Rsubread (versão 1.34.7) com
1852 configurações padrão, considerando leituras com pontuações de sequenciamento
1853 ao longo do comprimento da leitura que estavam acima de 33.

1854 As leituras mapeadas foram resumidas no nível do gene de acordo com a
1855 Anotação ENSEMBL RefSeq (Bos.taurus. Ars 1.2 mcd genoma assembly) de
1856 maneira específica da cadeia. Para evitar genes pouco expressos, consideramos
1857 genes com mais de 3 contagens de leitura em pelo menos 3 bibliotecas. As

1858 contagens e o resumo foram obtidos com a função FeatureCounts do pacote
1859 Rsubread com a opção StrandSpecific e configurações padrão. A análise da
1860 expressão gênica diferencial foi realizada usando o pacote DESEQ2 R
1861 considerando o método Benjamini-Hochberg ('BH', FDR <0,1) e a alteração log2
1862 vezes definida como maior (menor) que 0,6 (0,6).

1863

1864 3.7 Pré-processamento dos dados de sequenciamento

1865 Durante o sequenciamento, erros são introduzidos. Isto se deve às
1866 limitações técnicas das plataformas de sequenciamento. Esses erros podem
1867 distorcer a análise e levar a uma interpretação incorreta dos dados. Além disso,
1868 adaptadores também podem estar presentes se as leituras forem maiores que os
1869 fragmentos sequenciados. Assim, o controle de qualidade dos dados brutos é um
1870 primeiro passo essencial na análise genômica.

1871 A avaliação da qualidade dos dados brutos de sequenciamento foi
1872 realizada utilizando a ferramenta FastQC ([//www.bioinformatics.babraham.ac.uk](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk)),
1873 que confirmou a presença de uma pequena parcela de *reads* de baixa qualidade,
1874 possivelmente contendo erros de sequenciamento.

1875 Assim, o pré-processamento foi realizado utilizando a ferramenta Cutadapt
1876 (versão 4.4) (Martin, 2011) utilizando os seguintes parâmetros: tamanho mínimo
1877 dos *reads*: 20; qualidade mínima Phred: 20. A avaliação da qualidade dos dados
1878 pré-processados pelo Cutadapt foi novamente avaliada utilizando a ferramenta
1879 FastQC, que confirmou que as bases de baixa qualidade foram removidas dos
1880 *reads*.

1881

1882 3.8 Mapeamento contra genoma referência bovino

1883 Para determinar a quais genes os *reads* sequenciados pertenciam, o
1884 próximo passo foi realizar o mapeamento dos *reads* contra o genoma de
1885 referência bovino, obtido no site do NCBI
1886 (www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/9913). A versão do genoma de *Bos*
1887 *taurus* utilizada foi a ARS-UCD2.0 (2023). O mapeamento foi feito utilizando-se a
1888 ferramenta RNA STAR (versão 2.7.10) (Dobin et al., 2012).

1889

1890 3.9 Análise de Expressão Diferencial

1891 Utilizando-se o resultado de mapeamento dos dois grupos analisados (CFA
1892 alta e CFA baixa), sendo três réplicas biológicas para cada grupo, foi realizada a
1893 análise estatística de expressão diferencial com a ferramenta DESeq2 (Love et
1894 al., 2014), implementado na interface interativa DEApp (Li e Andrade, 2017). Os
1895 parâmetros para determinação de genes diferencialmente expressos foram os
1896 seguintes: FDR (valor-p ajustado): 0,05; *Fold Change* (FC): 1,5. Para evitar genes
1897 pouco expressos, consideramos genes com mais de 3 contagens de leitura em
1898 pelo menos 3 bibliotecas.

1899 3.10 Análise de enriquecimento funcional

1900 A análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente
1901 expressos (FDR<0,05) em termos do *Gene Ontology* (GO) – processos biológicos
1902 (BP) componente celular (CC) – e vias metabólicas do banco de dados da
1903 Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto - KEGG (*Kyoto Encyclopedia of*
1904 *Genes and Genomes*) foi efetuada com o auxílio da ferramenta *online* DAVID
1905 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), que coleta e
1906 integra informações sobre interações funcionais entre genes/proteínas para um
1907 grande número de organismos, para verificar e visualizar interações funcionais

1908 entre os DEGs (genes diferentemente expressos) de processos biológicos e vias
1909 da KEGG identificadas.

1910

1911 3.11 Análise estatística

1912 Para todas as análises (com exceção do RNA-seq), cada novilha foi
1913 considerada uma unidade experimental. A CFA média, prenhez, escore de útero,
1914 escore de remoção de tinta da cauda (intensidade do estro), área de olho de
1915 lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e da picanha (EGP),
1916 diâmetro dos ovários, número de folículos, diâmetro de folículos dominantes,
1917 diâmetro de corpo lúteo foram obtidos pelo PROC MEANS usando SAS
1918 (University Edition). As médias dos grupos de CFA foram comparadas utilizando
1919 PROC GLIMMIX SAS (University Edition).

1920 A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as taxas
1921 médias de CFA e prenhez. A relação entre CFA e probabilidade de prenhez foi
1922 determinada por regressão logística usando o PROC LOGISTIC no SAS. As
1923 variáveis também foram analisadas por correlação utilizando PROC CORR.

1924 Para todas as análises, foi considerada valor estatisticamente diferente
1925 quando $P < 0,05$.

1926

1927 **3. Resultados**

1928 A CFA das novilhas deste estudo variou entre 4 e 52, e correspondeu a
1929 média de $22,7 \pm 8,5$ folículos. A taxa de concepção média foi de 55%, e a média
1930 não variou entre os grupos de CFA. Na avaliação de ultrassonografia de carcaça
1931 não foram encontradas diferenças entre os grupos (Tabela 1).

1932

1933 Tabela 1. CFA, taxa de concepção e medidas ultrassonográficas de carcaça das novilhas
1934 F1 Nelore X Angus geral e nos grupos de CFA.

	Média	Baixa CFA	Média CFA	Alta CFA	Valor de P
CFA	22,7 (±8,5)	≤14 (29/140)	15 a 30 (90/140)	≥31(21/140)	-
Taxa de concepção (%)	55	44,8 ^a (13/29)	57,7 ^a (52/90)	57,1 ^a (12/21)	>0,05
AOL (mm ³)	48,37 (±5,6)	46,33 ^a	49,23 ^a	45,2 ^a	0,5133
EG (mm)	4,64 (±1,3)	4,15 ^a	4,56 ^a	4,45 ^a	0,5377
EGP (mm)	6,85 (±1,6)	6,4 ^a	6,59 ^a	7,46 ^a	0,7840

1935 AOL=área de olho de lombo; EG=espessura de gordura; EGP= espessura de gordura da garupa.

1936 ^aLetras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos baixa e alta
1937 CFA, considerando P<0,05.

1938

1939 A avaliação dos ovários por meio de ultrassonografia não demonstrou relação
1940 com a CFA (P>0,05) nos momentos avaliados (D0 e D10).

1941

1942 Tabela 2. Avaliação ultrassonográfica dos ovários das fêmeas, no D0 e D10 do protocolo
1943 de IATF.

Variável	Baixa CFA	Média CFA	Alta CFA	Valor de P
Presença de FD D0 (%)	50 ^a (14/29)	42,2 ^a (35/90)	60 ^a (12/21)	0,3572
Diâmetro FD D0 (mm)	9 ^a	9,6 ^a	8,3 ^a	0,1556
Presença de CL D0 (%)	39,3 ^a (8/20)	51,3 ^a (41/80)	48 ^a (9/21)	0,4483
Diâmetro de CL D0 (mm)	18 ^a	21 ^a	18 ^a	0,6223
Presença de FD D10 (%)	42,8 ^a (9/21)	52,3 ^a (34/65)	50 ^a (5/10)	0,6331
Diâmetro FD D10 (mm)	12,5 ^a	14 ^a	21 ^a	0,5533

1944 *Os valores apresentados representam a média das variáveis encontradas por fêmea por grupo de
1945 CFA.

1946 FD= folículo dominante; CL = corpo lúteo; D0 e D10= dias do protocolo de IATF.

1947 ^aLetras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos baixa e alta
1948 CFA, considerando P<0,05.

1949 Não foram encontradas diferenças entre a CFA e as estruturas
1950 encontradas nos ovários *post mortem* (P>0,05), exceto para o diâmetro do ovário,
1951 o qual foi maior para o grupo alta CFA (P=0,0437).

1952

1953 Tabela 3. Avaliação da morfologia dos pares de ovários obtidos após abate das fêmeas
1954 em estudo. Os valores apresentados representam a média por par de ovário por grupo de
1955 CFA.

Variável	Baixa CFA	Média CFA	Alta CFA	Valor de P
Nº total de oocitos	24,8 ^a	39 ^a	43,9 ^a	0,4818
Volume FD (mL)	0,56 ^a	0,92 ^a	0,43 ^a	0,4502
Diametro CL (cm)	14,4 ^a	15,75 ^a	10,3 ^a	0,7754
Diametro OV (cm))	28,3 ^a	30 ^{a,b}	34 ^b	0,0437
Nº COCs GI	5,5 ^a	12,1 ^a	11,4 ^a	0,2211
Nº COCs GII	4,8 ^a	8,4 ^{a,b}	10,4 ^b	0,1588
Nº COCs GIII	6,7 ^a	9 ^a	7,3 ^a	0,7119
Nº COCs GIV	0	0	0	-
Nº COCs desn	3,6 ^a	5,75 ^a	5 ^a	0,5237
Nº COCs exp	3 ^a	5,8 ^a	5 ^a	0,4709
Nº COCs deg	12 ^a	6,33 ^a	2,2 ^a	0,5191
Taxa de viabilidade	37,8 ^a	42,8 ^a	39,8 ^a	0,7958

1956 FD= foliculo dominante; CL = corpo lúteo; OV= ovário; COCs= complexo cumulus-oócitos

1957 GI= grau I; GII= grau II; GIII= grau III; GIV= grau IV; desn= desnudos; exp= expandidos; deg=

1958 degenerados (Stojovic et al., 2001)

1959 ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos baixa e alta

1960 CFA, considerando $P < 0,05$.

1961

1962 As comparações por análise de bioinformática foram realizadas entre os
 1963 grupos de baixa e alta CFA e foram considerados genes diferencialmente
 1964 expressos aqueles com valor $p < 0,05$. A análise por escala multidimensional
 1965 (Figura 1) revelou haver similaridade de casos individuais em alguns conjuntos de
 1966 dados, no entanto também houve amostras agrupadas em regiões separadas.
 1967 Esses dados não impediram que as análises fossem realizadas.

1968 Foram identificados 32 genes diferentemente expressos entre os grupos
 1969 baixa e alta CFA (Tabela 4 e 5; Figura 2). Desses, 30 estavam *up regulated* no
 1970 grupo de baixa CFA (Tabela 4), enquanto apenas 2 estavam *down regulated* no
 1971 grupo de baixa CFA em relação ao de alta CFA.

1972

1973

1974

1975

1976

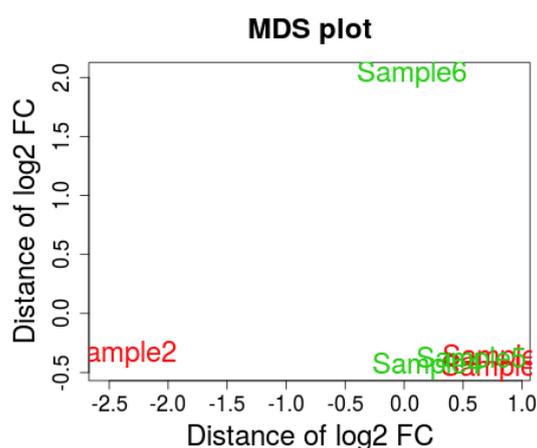
1977

1978

1979

1980

1981



1982

1983

Figura 1. Análise de escala multidimensional (MDS plot), utilizada para reconhecer padrões entre as amostras. Podemos notar que em algumas posições houve agrupamento de amostras dos dois grupos, no entanto em outras as amostras estavam separadas, o que é o esperado.

1984

1985 **Tabela 4.** Genes anotados e diferencialmente expressos entre os grupos de baixa e alta CFA,

1986 sendo up regulated no grupo de baixa CFA.

Ensembl ID ¹	Gene ID ²	baseMean ³	log2FoldChange ⁴	Pvalue ⁵	Padj ⁶
ENSBTAG00000020420	AP1S2	1,80E+14	1,54E+14	6,26E+07	1,48 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000040055	CAB39	2,90E+14	1,03E+14	8,37E+09	3,29 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000016455	CACHD1	3,27E+14	1,29E+14	2,04E+09	1,21 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000000911	UBE2H	4,59E+14	0.974838923956239	3,50E+08	1,72 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000017793	KLRG2	6,91E+14	1,23E+14	7,30E+09	3,07 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000011413	CCDC107	9,23E+14	0.855659919620973	1,15E+09	8,50 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000000341	ISOC1	1,83E+14	1,27E+14	5,28E+09	2,49 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000010689	NRG2	2,59E+14	1,17E+14	0.000116985756384877	4,06 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000020490	NACC2	1,09E+14	1,39E+14	7,31E+08	6,42 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000001824	SLC2A6	1,61E+14	0.982012640065337	8,22E+08	3,29 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000005688	MRPS2	7,58E+14	1,21E+14	1,72E+08	1,12 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000011224	CITED2	2,56E+13	1,35E+14	1,77E+07	5,23 x 10 ⁻⁴
ENSBTAG00000001414	KCTD12	4,00E+13	1,36E+14	1,93E+09	1,20 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000011471	CARS2	7,97E+14	1,04E+14	0.000111920772913359	4,01 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000006579	P4HA3	1,93E+14	0.985693496700105	2,77E+08	1,55 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000011793	FDX1	9,36E+14	1,19E+14	6,87E+08	6,42 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000006515	ESPN	6,32E+13	1,48E+14	4,44E+08	4,76 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000020760	SNAP29	3,32E+14	1,33E+14	4,08E+08	4,76 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000006656	RANBP1	1,62E+14	1,57E+14	7,68E+03	9,05 x 10 ⁷
ENSBTAG00000011334	NADK2	1,21E+14	1,06E+14	1,22E+08	2,24 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000050317	MRPL36	2,23E+14	1,62E+14	4,97E+06	2,93 x 10 ⁻⁴
ENSBTAG00000005685	HSD11B2	1,97E+14	1,14E+12	5,91E+09	2,68 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000010311	MRM1	3,76E+14	1,26E+14	4,37E+08	4,76 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000007003	TYMS	9,29E+14	1,14E+14	1,07E+09	8,41 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000017279	VAPA	2,13E+14	1,28E+14	3,47E+08	4,76 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000021801	INPP5F	6,78E+14	1,10E+14	7,63E+08	6,42 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000047495	CD81	1,49E+14	1,09E+14	3,03E+09	1,55 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000046644	HRAS	5,85E+14	1,31E+14	9,53E+06	3,74 x 10 ⁻⁴
ENSBTAG00000046033	UBFD1	3,30E+14	1,08E+13	1,33E+08	2,24 x 10 ⁻³
ENSBTAG00000014101	TSR3	2,87E+14	1,21E+14	1,63E+08	1,12 x 10 ⁻²

1987 ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas, de todas as amostras

1988 de ambos os grupos; ⁴Log2 fold Change do grupo alta para baixa; ⁵Valor de P; ⁶Valor de P

1989 ajustado para múltiplos testes.

1990

1991 Tabela 5. Genes anotados e diferencialmente expressos, sendo down regulated no grupo de
 1992 baixa CFA.

Ensembl ID ¹	Gene ID ²	baseMean ³	log2FoldChange ⁴	Pvalue ⁵	Padj ⁶
ENSBTAG00000015358	ALDOB	3,00E+14	-1,21E+14	1,12E-04	4,01 x 10 ⁻²
ENSBTAG00000009350	PLA2G12B	9,45E+13	-1,20E+14	6,77E+09	2,96 x 10 ⁻²

1993 ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas, de todas as amostras
 1994 de ambos os grupos; ⁴Log2 fold Change do grupo alta para baixa; ⁵Valor de P; ⁶Valor de P
 1995 ajustado para múltiplos testes.

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

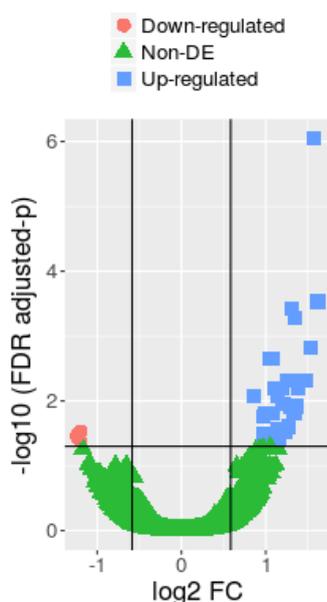


Figura 2 . *Volcano plot*. O eixo y é referente ao $-\log_{10}$ dos valores de p não ajustados e o eixo x é referente ao \log_2 da diferença de expressão para cada um dos genes. Os pontos vermelhos são os genes regulados negativamente e os azuis regulados positivamente no grupo baixa CFA.

2008

2009 A partir do resultado da análise de expressão gênica diferencial, foi
 2010 realizada a análise de enriquecimento funcional, na qual foi calculado quais eram
 2011 os termos ontológicos e *KEGG* mais e menos relevantes entre os genes
 2012 diferencialmente expressos. No total foram encontrados 25 termos, dos quais 17
 2013 (68%) eram referentes ao domínio “Processo Biológico”, 32 eram referentes ao
 2014 domínio “Componente Celular” e não houve termos referentes a Função
 2015 Molecular”. Além dos GOs, foi encontrado um termo *KEGG pathway* (Tabela 6).

2016

2017

2018 **Tabela 6.** Resultados da análise de enriquecimento funcional dos genes contendo termos *Gene*
 2019 *Ontology (GO)* e *KEGG* relacionados a processos biológicos de genes expressos a partir de
 2020 RNAseq de oócitos de novilhas Nelore x Angus.

Category	GO/KEGG ID	Descrição	%	PValue	Genes
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237	Cellular metabolic process	68,75	$2,23 \times 10^{-2}$	UBE2H, PLA2G12B, CAB39, CITED2, CD81, TSR3, MRPS2, MRPL36, TYMS, MRM1, SLC2A6, HSD11B2, NADK2, INPP5F, VAPA, P4HA3, NACC2, FDX1, ALDOB, HRAS, CARS2, SNAP29
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238	Primary metabolic process	65,625	$4,45 \times 10^{-2}$	UBE2H, PLA2G12B, CAB39, CITED2, CD81, TSR3, MRPS2, MRPL36, TYMS, MRM1, SLC2A6, HSD11B2, NADK2, INPP5F, VAPA, P4HA3, NACC2, FDX1, ALDOB, HRAS, CARS2
GOTERM_BP_ALL	GO:0044710	Single-organism metabolic process	40,625	$4,02 \times 10^{-3}$	PLA2G12B, CD81, TYMS, SLC2A6, HSD11B2, NADK2, INPP5F, VAPA, P4HA3, FDX1, ALDOB, HRAS, CARS2
GOTERM_BP_ALL	GO:0006796	Phosphate-containing compound metabolic process	31,25	$1,38 \times 10^{-2}$	NADK2, PLA2G12B, INPP5F, CAB39, VAPA, CD81, ALDOB, TYMS, HRAS, SLC2A6
GOTERM_BP_ALL	GO:0006793	Phosphorus metabolic process	31,25	$1,61 \times 10^{-2}$	NADK2, PLA2G12B, INPP5F, CAB39, VAPA, CD81, ALDOB, TYMS, HRAS, SLC2A6
GOTERM_BP_ALL	GO:1901564	Organonitrogen compound metabolic process	28,125	$1,13 \times 10^{-2}$	NADK2, VAPA, P4HA3, MRPS2, MRPL36, ALDOB, TYMS, CARS2, SLC2A6
GOTERM_BP_ALL	GO:0019637	Organophosphate metabolic process	25,0	$5,36 \times 10^{11}$	NADK2, PLA2G12B, INPP5F, VAPA, CD81, ALDOB, TYMS, SLC2A6
GOTERM_BP_ALL	GO:0044281	Small molecule metabolic process	25,0	$1,57 \times 10^{-2}$	HSD11B2, NADK2, P4HA3, FDX1, ALDOB, TYMS, CARS2, SLC2A6
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629	Lipid metabolic process	18,75	$3,70 \times 10^{-2}$	HSD11B2, PLA2G12B, INPP5F, VAPA, CD81, FDX1
GOTERM_BP_ALL	GO:0016192	Vesicle-mediated transport	18,75	$4,13 \times 10^{-2}$	INPP5F, VAPA, CD81, AP1S2, HRAS, SNAP29
GOTERM_BP_ALL	GO:1901566	Organonitrogen compound biosynthetic process	18,75	$4,45 \times 10^{-2}$	NADK2, VAPA, MRPS2, MRPL36, TYMS, CARS2
GOTERM_BP_ALL	GO:0006644	Phospholipid metabolic process	12,5	$1,94 \times 10^{-2}$	PLA2G12B, INPP5F, VAPA, CD81
GOTERM_CC_ALL	GO:0005737	Cytoplasm	71,875	$6,34 \times 10^{-3}$	RANBP1, CAB39, CITED2, TSR3, MRPS2, MRPL36, TYMS, ESPN, MRM1, SLC2A6, HSD11B2, NADK2, INPP5F, VAPA, P4HA3, NACC2, FDX1, AP1S2, ISOC1, ALDOB, HRAS, CARS2, SNAP29
GOTERM_CC_ALL	GO:0044444	Cytoplasmic part	59,375	$1,19 \times 10^{-2}$	RANBP1, CITED2, MRPS2, MRPL36, TYMS, MRM1, SLC2A6, HSD11B2, NADK2, INPP5F, VAPA, P4HA3, NACC2, FDX1, AP1S2, ALDOB, HRAS, CARS2, SNAP29
GOTERM_CC_ALL	GO:0043233	Organelle lumen	34,375	$4,65 \times 10^{-2}$	HSD11B2, CITED2, P4HA3, NACC2, FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, HRAS, CARS2, SNAP29
GOTERM_CC_ALL	GO:0031974	Membrane-enclosed lumen	34,375	$4,65 \times 10^{-2}$	HSD11B2, CITED2, P4HA3, NACC2, FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, HRAS, CARS2, SNAP29

GOTERM_CC_ALL	GO:0070013	Intracellular organelle lumen	34,375	4,65 x 10 ⁻²	HSD11B2, CITED2, P4HA3, NACC2, FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, HRAS, CARS2, SNAP29
GOTERM_CC_ALL	GO:0005739	Mitochondrion	25,0	5,93 x 10 ⁻³	NADK2, NACC2, FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, CARS2, MRM1
GOTERM_CC_ALL	GO:0005759	Mitochondrial matrix	15,625	9,74 x 10 ⁻¹⁰	FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, CARS2
GOTERM_CC_ALL	GO:0044429	Mitochondrial part	15,625	4,44 x 10 ⁻²	FDX1, MRPS2, MRPL36, TYMS, CARS2
KEGG_PATHWAY	bta01100	Metabolic pathways	21,875	9,38 x 10 ⁻²	HSD11B2, NADK2, PLA2G12B, INPP5F, P4HA3, ALDOB, TYMS

2021 ¹Categoria da via; ²Identificação universal; ³Descrição; ⁴% de genes identificados e envolvidos;

2022 ⁵Valor de P; ⁶Genes envolvidos.

2023

2024 4. Discussão

2025

2026 Esse estudo fornece os primeiros dados da relação da CFA com a
 2027 fertilidade *in vivo* de novilhas Nelore x Angus, apoiados pelos resultados de
 2028 campo com avaliação ultrassonográfica de ovário, prenhez à IATF, morfologia
 2029 ovariana e expressão gênica por RNA-seq de genes e vias relacionadas a
 2030 fertilidade. Embora sejam encontrados na literatura diversos artigos tratando da
 2031 fertilidade de fêmeas com diferentes CFAs, poucos relatos trazem resultados para
 2032 novilhas. Em especial para o cruzamento em estudo, não foi encontrada literatura
 2033 relacionada.

2034 Inicialmente foi constatado nesse estudo que a taxa de concepção das
 2035 novilhas alcançou a média de 55%, e está de acordo com o relatado por Campos
 2036 (2020), ao encontrar 55,87% de probabilidade de prenhez para novilhas precoces
 2037 F1 Nelore x Angus. Para essa categoria animal espera-se encontrar taxa de
 2038 gestação variando entre 40% e 59% (Gottschall e Silva, 2018; Nonato et al., 2019)
 2039 demonstrando que a inclusão dessa categoria nos programas reprodutivos pode
 2040 ser um bom gerador de renda na propriedade. Quando observada a taxa de

2041 gestação por grupo de CFA constatou-se que as fêmeas com alta CFA (≥ 31)
2042 apresentaram taxa de concepção 13% superior às novilhas com baixa CFA (≤ 14).

2043 Em bovinos leiteiros de origem taurina, Jimenez-Krassel et al. (2017)
2044 mostraram vantagens produtivas e reprodutivas para fêmeas com baixa CFA,
2045 enquanto uma contagem alta foi associada a uma vida produtiva mais curta
2046 dentro do rebanho e fertilidade abaixo do ideal. No entanto, todos esses achados
2047 reforçam uma questão controversa e altamente complexa da relação entre a CFA
2048 e fertilidade (Morotti et al., 2015; 2017), uma vez que a maioria dos trabalhos que
2049 comparam a taxa de prenhez com a CFA em animais de corte e leite *Bos taurus*
2050 revela maior fertilidade para fêmeas com uma alta CFA (Ireland et al., 2007;
2051 Ireland et al, 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; Ireland et al., 2011; Evans et al.,
2052 2012; Mossa et al., 2012; Jimenez-Krassel et al., 2015; Martinez et al., 2016;
2053 Oliveira Junior et al., 2021). Enquanto isso para fêmeas cruzadas (*Bos indicus* x
2054 *Bos taurus*), Santos et al. (2012) relataram que a CFA não influenciou as taxas de
2055 gestação para fêmeas Braford, no entanto para o cruzamento utilizado nesse
2056 estudo não existem relatos da relação da taxa de prenhez com a CFA.

2057 Sendo comprovada a relação da CFA com a fertilidade, a proposta seria
2058 utilizá-la como ferramenta de seleção, no entanto, para isso é importante a
2059 certificação de que esta característica não interfere negativamente com outras
2060 características de produção essenciais para animais com aptidão para o corte,
2061 especialmente no caso dessa propriedade cuja produção é destinada a produção
2062 de carnes do tipo Premium. Por esse motivo, nesse estudo foram incluídas as
2063 avaliações de carcaça, AOL, EG e EGP. Como esperado não foram encontradas
2064 diferenças e correlações significativas entre essas características e a CFA, assim
2065 como já foi relatado pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando as imagens

2066 ultrassonográficas de carcaça de novilhas Nelore com diferentes CFAs (Gheller et
2067 al., 2023). Morotti et al. (2017) avaliaram correlações entre características
2068 fenotípicas e genotípicas e a CFA em novilhas Braford (3/8 Nelore x 5/8 Hereford)
2069 e também não encontraram diferença entre as fêmeas com baixa e alta CFA
2070 quanto as características de mérito genético mais utilizadas para seleção em
2071 programa de melhoramento genético. Esses resultados indicam que a seleção de
2072 fêmeas utilizando o número de folículos antrais não afetaria a expressão de
2073 características importantes para o melhoramento genético das fêmeas bovinas.

2074 Avaliamos pelo método de ultrassonografia transretal os ovários das
2075 fêmeas em estudo, a fim de identificar e mensurar as estruturas presentes que
2076 pudessem identificar fêmeas púberes e associar os achados com a CFA. No
2077 entanto, não encontramos diferenças para a presença e diâmetro de FD no D0 e
2078 D11, e CL no D0 entre os animais com diferentes CFAs. Morotti et al. (2018)
2079 avaliaram a dinâmica folicular de vacas Nelore durante o protocolo de IATF e
2080 demonstraram que o tamanho do FD é maior para as fêmeas com menor CFA
2081 (≤ 15), no entanto não houve relação da CFA com o diâmetro de ovário. Nesse
2082 mesmo sentido, Santos et al. (2012) utilizando fêmeas Braford (*Bos indicus* x *Bos*
2083 *taurus*), observaram maior taxa de crescimento folicular e maior diâmetros
2084 foliculares quanto menor fosse a CFA. No entanto, para fêmeas do cruzamento
2085 em estudo (Nelore x Angus) os dados do presente trabalho são pioneiros nessa
2086 perspectiva.

2087 Para aprofundar o estudo da morfologia ovariana das fêmeas em estudo,
2088 foram avaliadas as estruturas presentes no ovário (Tabela 3) após coleta dos
2089 ovários no abatedouro, assim como já foi realizado por Dominguez (1995) e Silva
2090 et al. (2023). Assim como Silva et al. (2023) encontraram maior DOV para fêmeas

2091 *Bos indicus* com maior CFA, nós constatamos resultados semelhantes para as
2092 fêmeas cruzadas (Nelore x Angus). Esse resultado também foi encontrado em
2093 avaliações ultrassonográficas para fêmeas taurinas (Ireland et al., 2008) e fêmeas
2094 zebuínas (Rodrigues et al., 2015; Morotti et al., 2018). Exceto o diâmetro OV,
2095 constatamos que a CFA não variou em função das demais estruturas observadas
2096 nos pares de ovários. Podemos observar que os dados encontrados nessa
2097 avaliação *post mortem*, complementam os resultados das avaliações
2098 ultrassonográficas de ovário *in vivo* das mesmas fêmeas, permitindo inferir que a
2099 CFA das novilhas em estudo não varia em função das estruturas ovarianas, no
2100 entanto influencia positivamente no tamanho do ovário.

2101 Além da análise da morfologia ovariana, no presente trabalho não foram
2102 encontradas diferenças entre a qualidade de oócitos e a taxa de viabilidade, e a
2103 CFA. A qualidade oocitária, assim como a quantidade de oócitos recuperados,
2104 está diretamente relacionada com a qualidade do embrião produzido. Existem
2105 muitos relatos que descrevem maior número de oócitos coletados quando as
2106 fêmeas doadoras apresentam maior CFA e, conseqüentemente, há maior número
2107 de embriões produzidos *in vitro* (Ireland et al., 2007, 2008; Silva -Santos et al.,
2108 2014; Santos et al., 2016). No entanto, há inconsistências nos resultados
2109 referentes as taxas de recuperação de oócitos e à proporção de embriões
2110 produzidos *in vitro* de fêmeas com baixa e alta CFA entre as diferentes raças
2111 (Silva-Santos et al., 2014; Nagai et al., 2016; Monteiro et al., 2017). Por exemplo,
2112 Garcia et al., (2020) utilizando fêmeas Nelore, encontraram maior número de
2113 oócitos para fêmeas com alta CFA, enquanto as taxas de desenvolvimento
2114 embrionário até o estágio de blastocisto não diferiram. Por outro lado, utilizando
2115 fêmeas de cruzamento de origem semelhante ao do presente trabalho, Silva-

2116 Santos et al. (2014) relataram que fêmeas Braford (*Bos indicus* x *Bos taurus*)
2117 apresentaram maior número de oócitos recuperados na OPU e maior produção de
2118 embriões *in vitro* para doadoras com alta CFA (≥ 40). Dessa forma acredita-se que
2119 utilizar fêmeas Braford com alta CFA incrementa o número de embriões
2120 produzidos (Silva-Santos et al., 2014) sem prejudicar as características de mérito
2121 genético utilizadas por programas de melhorando genético (Morotti et al., 2017).

2122 Considerando os resultados encontrados e relatados anteriormente, pelo
2123 nosso grupo de pesquisa e outros pesquisadores, é evidente que as diferenças
2124 relacionadas à produção *in vitro* de embriões e a fertilidade da IATF estejam
2125 relacionadas a diversos fatores e não apenas associados à dinâmica folicular,
2126 mas também a fatores relacionados a vias metabólicas, desenvolvimento celular
2127 folicular, à competência oocitária, entre outros. Para isso, investigamos os
2128 padrões de expressão gênica a partir de oócitos de fêmeas com baixa e alta CFA.
2129 Foram identificados 32 padrões transcricionais de genes diferentemente
2130 expressos entre os grupos de baixa e alta CFA, além disso o enriquecimento de
2131 informações genômicas demonstrou participação dos genes expressos em vias
2132 canônicas importantes nos processos biológicos e celulares, nos quais buscamos
2133 através do projeto *Gene Ontology* (GO) três domínios: “Processos Biológicos”,
2134 “Função Molecular” e “Componente Celular”.

2135 Como podemos observar, 91% dos genes diferentemente expressos foram
2136 *up regulated* para baixa CFA, ou seja, foram mais expressos nos oócitos de
2137 fêmeas com menor população de folículos. Dentre os genes diferentemente
2138 expressos, 22% já foram relatados em estudos com a fertilidade humana e
2139 bovina, sendo eles CAB39 (MO25), SLC2A6 (GLUT6), CITED2, FDX1, HSD11B2,
2140 CD81 e Pla2g12b. CAB39 tem a função de regular as proteínas quinases,

2141 responsáveis pela comunicação intracelular e, regulação e transdução de sinais
2142 por meio de alterações químicas e estruturais (Bonilla et al., 2011). Embora em
2143 termos gerais o gene CAB39 seja responsável por processos biológicos básicos,
2144 ele já foi associado a invasão celular em cânceres hepáticos (Jiang et al., 2017) e
2145 pancreáticos (Guo et al., 2017), e a perda de gestação em bovinos (Oliver et al.,
2146 2019). SLC2A6 ou GLUT6 faz parte da família dos genes responsáveis pelo
2147 transporte de glicose através da membrana plasmática (Kim Et al., 2014). Outros
2148 genes dessa família como o GLUT4, GLUT9 e GLUT12 já foram descritos como
2149 importantes para regulação do desenvolvimento de oócitos e taxa de implantação
2150 embrionária, enquanto a expressão de GLUT6 foi notada em oócitos de mulheres
2151 com síndrome dos ovários policísticos com resistência à insulina (Kim et al.,
2152 2014). Byrne et al. (2014) e Maedera et al. (2018) encontraram o gene GLUT6 *up*
2153 *regulated* em células cancerígenas no endométrio feminino. Apesar desse gene
2154 ter sido encontrado no nosso trabalho e em outros (Phay et al., 2000; Kim et al.
2155 2014), os mecanismos desempenhados por ele na fertilidade ainda não estão
2156 bem esclarecidos.

2157 Outro gene diferentemente expresso entre os grupos de CFA foi o FDX1.
2158 FDX1 é uma proteína ferro-enxofre, uma monooxigenase que facilita a reação
2159 enzimática do citocromo P450 (Sheftel et al., 2010; Imamichi et al., 2013). Ele é
2160 altamente expresso no ovário, mas seus efeitos nas células da granulosa durante
2161 os estágios de desenvolvimento da síndrome dos ovários policísticos (SOP) ainda
2162 não foram elucidados com precisão (Wang et al., 2021; Xing et al., 2023; Zhou et
2163 al., 2023). Xing et al. (2023) encontraram relação da maior expressão de FDX1
2164 em células da granulosa com a síndrome dos ovários policísticos em mulheres,

2165 estando intimamente relacionada ao desenvolvimento folicular anormal, pois
2166 afetou a regulação da proliferação celular, apoptose e autofagia.

2167 O gene CITED2, por sua vez, funciona como um coativador ou repressor
2168 transcricional, dependendo do contexto (Bhattacharya et al., 1999; Braganca et
2169 al., 2003). Acredita-se que este esteja envolvido com o desenvolvimento de
2170 oócitos, uma vez que o perfil de expressão gênica constatou que CITED2 estava
2171 marcadamente aumentado no início do crescimento de oócitos em folículos
2172 primordiais de camundongos (Pan et al., 2005). Nos folículos ovarianos bovinos
2173 esse gene é regulado positivamente em folículos grandes em relação aos
2174 pequenos (Hatzirodos et al., 2014). Fang et al. (2016) avaliaram o CITED2 como
2175 um biomarcador para qualidade oocitária e demonstraram que os oócitos que
2176 apresentaram níveis mais baixos de expressão do CITED2 apresentaram maiores
2177 taxas de fertilização, embrião transferível e implantação, ou seja, a maior
2178 expressão desse gene está associada a pior qualidade de oócito e taxa de
2179 gestação. Nesse mesmo sentido, a regulação positiva do CDB1 revela uma forte
2180 relação com a perda embrionária em humanos, uma vez que níveis elevados
2181 inibem a invasão do citotrofoblasto, prejudicando o processo de placentação (Ding
2182 et al., 2018; Lane et al., 2020).

2183 Dentre os dois genes *down regulated* no grupo baixa CFA, merece
2184 destaque o *Pla2g12b*, que é um gene pertencente à família das fosfolipases A₂,
2185 com função secretora e pode ajudar a regular a quantidade de lipoproteínas no
2186 sangue (Dennis et al., 2011). Além disso, fosfolipases A₂, incluindo *Pla2g12b*,
2187 agindo em conjunto com a ciclooxygenase (COX) formam as prostaglandinas da
2188 série 2, e essas por sua vez possuem funções regulatórias importantes nos
2189 processos reprodutivos. As prostaglandinas da série 2 são de grande importância

2190 no parto e têm sido implicadas na regulação de muitos aspectos da função celular
2191 e nos processos de gravidez e parto em mamíferos, e são reconhecidas como
2192 fatores que promovem contrações miométriais, dilatação cervical e ruptura de
2193 membrana (Mosaad et al., 2020).

2194 Diante dos dados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que novilhas
2195 ½ Nelore X Angus com baixa CFA apresentaram regulação positiva de genes que
2196 já foram documentados como contrários a fertilidade, enquanto um gene
2197 importante para a fertilidade foi *down regulated* nesse grupo. Por outro lado, não
2198 foram encontrados genes que qualifiquem a qualidade oocitária. Apesar dos
2199 dados de campo não terem apresentado diferença estatística entre os grupos de
2200 CFA, as novilhas com CFA inferior a 14 folículos (baixa CFA), apresentaram taxa
2201 de concepção 13% inferior às de alta CFA, o que corrobora com os resultados da
2202 transcriptômica. É fato que estudos de campo com um maior número de animais
2203 são necessários para confirmar esses dados, principalmente para os sistemas de
2204 produção que vem sendo adotados na pecuária de corte, como é o caso deste
2205 que foi estudado, em que há alta pressão de seleção para fertilidade com
2206 descarte de novilhas jovens que não emprenham após a primeira IA. Nesses
2207 casos, a fertilidade do rebanho tende a aumentar rapidamente, uma vez que
2208 animais inférteis são descartados antes mesmo de deixar filhos no rebanho. Por
2209 esses motivos, nosso estudo esclareceu, que selecionar animais com maior CFA,
2210 como doadoras de oócitos para programas de produção de embriões, objetivando
2211 maior número de embriões produzidos, não representa risco para a fertilidade e a
2212 produção de carne.

2213

2214 **Referências Bibliográficas**

2215

2216 Bhattacharya, S., Michels, C.L., Leung, M.K., Arany, Z.P., Kung, A.L., Livingston,
2217 D.M., 1999. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during
2218 transactivation by HIF-1. *Genes Dev.* 13, 64-75. doi: 10.1101/gad.13.1.64.

2219

2220 Bonilla, A.Q., Oliveira, L.J., Ozawa, M., Newsom, E.M., Lucy, M.C., Hansen, P.J.,
2221 2011. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth
2222 factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol.* 30,332(1-2).
2223 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.10.009>

2224

2225 Bragança, J., Eloranta, J.J., Bamforth, S.D., Ibbitt, J.C., Hurst, H.C., Bhattacharya,
2226 S., 2003. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors,
2227 p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem.* 278, 16021-16029.
2228 <https://doi.org/10.1074/jbc.M208144200>

2229

2230 Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005,
2231 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high
2232 variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse
2233 association with serum follicle- stimulating hormone concentrations. *Biology of*
2234 *Reproduction.* 73, 53-62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>

2235

2236 Byrne, F.L., Poon, I.K., Modesitt, S.C., Tomsig, J.L., Chow, J.D., Healy, M.E.,
2237 Baker, W.D., Atkins, K.A., Lancaster, J.M., Marchion, D.C., Moley, K.H.,
2238 Ravichandran, K.S., Slack-Davis, J.K., Hoehn, K.L., 2014. Metabolic vulnerabilities

- 2239 in endometrial cancer. *Cancer Res.* 14, 5832-5845. <https://doi.org/10.1158/0008->
2240 5472.CAN-14-0254
- 2241
- 2242 Campo, R. D. 2020. Impacto da raça, do escore corporal e da categoria animal na
2243 taxa de prenhez de fêmeas bovinas em manejo de IATF. Dissertação (Mestrado
2244 em Produção Animal) – Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de
2245 Minas Gerais, 60f.
- 2246
- 2247 Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase
2248 A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical
2249 inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 111, 6130-6185.
2250 <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
- 2251
- 2252 Ding, H., Dai, Y., Lei, Y., Wang, Z., Liu, D., Li, R., Shen, L., Gu, N., Zheng, M.,
2253 Zhu, X., Zhao, G., Hu, Y., 2019. Upregulation of CD81 in trophoblasts induces an
2254 imbalance of Treg/Th17 cells by promoting IL-6 expression in preeclampsia. *Cell*
2255 *Mol Immunol.*16, 302-312. doi: 10.1038/s41423-018-0186-9.
- 2256
- 2257 Domínguez, M.M., 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed
2258 on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology.* 43, 1405-
2259 1418. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00126-S](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00126-S)
- 2260
- 2261 Evans, A.C.O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland,
2262 J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J., 2012. Effects of maternal environment during
2263 gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine

- 2264 offspring. *Reproduction in Domestic Animals*. 47, 31–37.
2265 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>
2266
- 2267 Fang, Y., Shang, W., Wei, D.L., Zeng, S.M., 2016. Cited2 protein level in cumulus
2268 cells is a biomarker for human embryo quality and pregnancy outcome in one in
2269 vitro fertilization cycle. *Fertil Steril*. 105, 1351-1359.
2270 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.12.137>
2271
- 2272 Garcia, S.M., Morotti, F., Cavalieri, F.L.B., Lunardelli, P.A., Santos, A.O.,
2273 Membrive, C.M.B., Castilho, C., Puelker, R.Z., Silva, J.O.F, Zangirolamo, A.F.,
2274 Seneda, M.M., 2020. Synchronization of stage of follicle development before OPU
2275 improves embryo production in cows with large antral follicle counts. *Anim Reprod*
2276 *Sci.* 221, 106601. DOI:10.1016/j.anireprosci.2020.106601.
2277
- 2278 Gheller, J. M., Silva, G. C., Silva, W. A. L., Silva, A. F., Costa Filho, L. C. C.,
2279 Nogueira, E., Melo-Sterza, F. A., 2023. Antral follicle count classification selects
2280 fertile heifers without influencing the carcass traits. *Semina: Ciências Agrárias*. 44,
2281 85-96. DOI: 10.5433/1679-0359.2022v44n1p85
2282
- 2283 Gottschall, C. S., Silva, L. R. 2018. Taxa de prenhez de novilhas de corte
2284 submetidas à IATF com protocolo a base de Benzoato de Estradiol ou Ovsynch
2285 modificado. *Pubvet*. 2, 1-6. DOI:10.31533/pubvet.v12n9a177.1-6
2286
- 2287 Gregianini, H. A. G., Carneiro Junior, J. M., Neto, A. P., Costa Filho, L. C. C.,
2288 Gregianini, J. T. F., Pinheiro, A. K., Trenkel, C. K. G., 2021. Precocidade sexual de

2289 novilhas Nelore em rebanho sob seleção no Estado do Acre. *Research, Society*
2290 *and Development*. 10, e16310413945. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13945>

2291

2292 Guo, R., Gu, J., Zhang, Z., Wang, Y., Gu, C., 2017. MiR-451 Promotes Cell
2293 Proliferation and Metastasis in Pancreatic Cancer through Targeting CAB39.
2294 *BioMed Research International*. 2017, 2381482.
2295 <https://doi.org/10.1155/2017/2381482>

2296

2297 Hatzirodos, N., Irving-Rodgers, H.F., Hummitzsch, K., Harland, M.L., Morris, S.E.,
2298 Rodgers, R.J., 2014. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian
2299 follicles during growth from small to large antral sizes. *BMC Genomics*.15, 24. doi:
2300 10.1186/1471-2164-15-24.

2301 <http://dxdoiorg/105433/1679-03592015v36n6p3741>

2302

2303 Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa,
2304 T., Miyamoto, K., 2013. Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian
2305 granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 6, 1-10.
2306 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.02.012>

2307

2308 Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W.,
2309 Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within
2310 individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the
2311 proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human*
2312 *Reproduction*. 22, 1687-1695. <http://dxdoiorg/101093/humrep/dem071>

2313

2314 Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F.,
2315 Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J., 2008, Antral
2316 follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
2317 follicles in ovaries of Young adult cattle. *Biology of Reproduction*. 79, 1219-1225.
2318 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
2319
2320 Jiang, L.; Yan, Q., Fang, S., Liu, M., Li, Y., Yuan, Y., Li, Y., Zhu, Y., Qi, J., Yang,
2321 X., Kwong, D.L.W., Guan, X., 2017. Calcium-binding protein 39 promotes
2322 hepatocellular carcinoma growth and metastasis by activating extracellular
2323 signal-regulated kinase signaling pathway. *Hepatology*. 66, 1529-1545, DOI:
2324 10.1002/hep.29312
2325
2326 Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J.
2327 S., Lonergan, P., Evans, A. C. O., Ireland, J. J., 2009. Evidence that high variation
2328 in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus
2329 luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of Reproduction*,
2330 80, 1272-1281. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093>
2331
2332 Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Ireland, J.L.H., Pursley, J.R.,
2333 Smith, G.W., Tempelman, R.J., Ferris, T., Roudebush, W.E., Mossa, F., Lonergan,
2334 P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., Concentration of anti Müllerian hormone in dairy
2335 heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*
2336 2015; 98: 3036-3045. <https://doi.org/10.3168/jds2014-8130>
2337

- 2338 Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Pursley, J.R., Ireland, J.J.,
2339 2017. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy
2340 heifers is predictive of a reduced productive herd life. *Journal of Dairy Science*.
2341 100, 1-9. <https://doi.org/10.3168/jds2016-12277>
- 2342
- 2343 Kim, E., Seok, H.H., Lee, S.Y., Lee, D.R., Moon, J., Yoon, T.K., Lee, W.S., Lee,
2344 K.A., 2014. Correlation between Expression of Glucose Transporters in Granulosa
2345 Cells and Oocyte Quality in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol*
2346 *Metab.* 29, 40-47. <https://doi.org/10.3803/EnM.2014.29.1.40>
- 2347
- 2348 Lane, L.S., McCallie, B.R., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., Dysregulated
2349 embryonic placentation is more significantly associated with risk of early
2350 spontaneous pregnancy loss than maternal uterine. *Fertility and Sterility*. 2020.
2351 144, 194-195. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.551>
- 2352
- 2353 Li, Y., Andrade, J., 2017. DEApp: An interactive web interface for differential
2354 expression analysis of next generation sequence data. *Source Code for Biology*
2355 *and Medicine*. 12. 10.1186/s13029-017-0063-4
- 2356
- 2357 Lima, M.A., Morotti, F., Bayeux, B.M., Rezende, R.G., Botigeli, R.C., Bem, T.H.C.,
2358 Fontes. P.K., Nogueira, M.F.G., Meirelles, F.V., Baruselli, P.S., Silveira, J.C.,
2359 Perecin, F., Seneda, M.M., 2020.. Ovarian follicular dynamics, progesterone
2360 concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus*
2361 females with a high or low antral follicle count. *Sci Rep.* 10, 19557.
2362 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>

2363

2364 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and
2365 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. doi:
2366 10.1186/s13059-014-0550-8.

2367

2368 Lowman, B. G., Scott, N. A., Somerville, S., 1976. Condition scoring of cattle.
2369 Edinburgh. School of Agriculture. 6.

2370

2371 Maedera, S., Mizuno, T., Ishiguro, H., Ito, T., Soga, T., Kusuhara, H., 2019.
2372 GLUT6 is a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and
2373 modulates glycolysis in macrophages. *FEBS Lett.* 593, 195-208.
2374 <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13298>

2375

2376 Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput
2377 sequencing reads. *EMBnet.journal.* 17. 10.14806/ej.17.1.200

2378

2379 Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L., 2016.
2380 Association between antral follicle count and reproductive measures in New
2381 Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system.
2382 *Theriogenology.* 85, 466-475. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.026>

2383

2384 Monteiro, F.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Bayeux, B.M., Accorsi, M.,
2385 Campanholi, S.P., Dias, E.A.R., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2017. Beef donor
2386 cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared

- 2387 with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions.
2388 *Theriogenology*.90, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>
2389
- 2390 Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.A., González, S.M., Marinho, L.S.R.,
2391 Seneda, M.M., 2015. Is the number of antral follicle an interesting selection
2392 criterium for fertility in cattle?. *Animal Reproduction*. 12, 479-486.
2393
- 2394 Morotti, F., Moretti, R., Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Cerqueira, P.H.R.,
2395 Seneda, M. M., 2018. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos*
2396 *indicus* cows with different antral follicle counts subjects to timed artificial
2397 insemination. *Animal Reproduction Science*. 188, 170-177.
2398 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001>
2399
- 2400 Morotti, F., Santos, G.M.G., Júnior, C.K., Silva-Santos, K.C., Roso, V.M., Seneda,
2401 M.M., 2017. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle
2402 population in beef heifers. *Theriogenology*. 15, 21-26.
2403 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.025>
2404
- 2405 Mosaad E., Peiris, H.N., Holland, O., Garcia, I.M., Mitchell, M.D., 2020. The
2406 Role(s) of Eicosanoids and Exosomes in Human Parturition. *Front Physiol*. 11,
2407 594313. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.594313>
2408
- 2409 Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan,
2410 P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian

2411 follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. Journal of
2412 Dairy Science. 95, 2355-2361. <https://doi.org/10.3168/jds2011-4325>

2413

2414 Nagai K., Yanagawa Y., Katagiri S., Nagano M., 2016. The relationship between
2415 antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-
2416 grown oocytes derived from early antral follicles. Biomed. Res. 37, 63–71.
2417 <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.63>

2418

2419 Nonato, M. S., Costa, M. G., Bezerra, A. R. A., Murta, D. C. R. X., Murta, D. V. F.,
2420 Santos, J. M. L., Barbosa, L. K. G., Rufino, C. A., 2019. Programa de IATF em
2421 novilhas púberes e prépuberes. Brazilian Journal of Development, 5, 24707-
2422 24712. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n11-148>

2423

2424 Oliveira Junior, G. A., Pinheiro, V. G., Fonseca, P. A. S., Costa, C. B., Pioltine, E.
2425 M., Botigelli, R. C., Razza, E. M., Ereno, R. L., Ferraz, J. B. S., Seneda, M. M.,
2426 Nogueira, M. F. F., 2021. Genomic and phenotypic analyses of antral follicle count
2427 in Aberdeen Angus cows. Livestock Science. 249, 1-7.
2428 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104534>

2429

2430 Oliveira Junior, J.S., Cardoso, C.J.T., Silva, W.A.L., Kischel, H., Souza, M.B.,
2431 Andrade, E.R., Nogueira, E., Silva-Santos, K.C., Seneda, M.M., Melo-Sterza, F.A.,
2432 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando
2433 breeds. Semina: Ciências Agrárias. 36, 3741-3750.

2434

- 2435 Pan, H., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Eppig, J.J., Schultz, R.M., 2005.
2436 Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of
2437 gonadotropin priming and development in vitro, *Developmental Biology*. 286, 493-
2438 506. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.023>
2439
- 2440 Phay, J.E., Hussain, H.B., Moley, J.F., 2002. Cloning and expression analysis of a
2441 novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9).
2442 *Genomics*. 66, 217–220. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6195>
2443
- 2444 Rodrigues, A.S., Oliveira, S.N., Loiola, M.V.G., Ferraz, P.A., Chalhoub, M.,
2445 Bittencourt, R.F., Araujo, E.A.B., Bittencourt, T.C.B.S.C., Ribeiro Filho, A.L., 2015.
2446 Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação
2447 artificial em tempo fixo. *Ciência Rural*. 45, 711-717 [http://dxdoiorg/101590/0103-](http://dxdoiorg/101590/0103-8478cr20140666)
2448 [8478cr20140666](http://dxdoiorg/101590/0103-8478cr20140666)
2449
- 2450 Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches, B.V.,
2451 Moraes, F.L.Z., Blaschi, W., Seneda, M.M., 2016. High numbers of antral follicle
2452 are positively associated with in vitro embryo production but not the conception
2453 rate for FTAI in Nelore cattle. *Animal Reproduction Science*. 165, 17-21.
2454 <https://doiorg/101016/janireprosci201511024>
2455
- 2456 Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Morotti, F., Marcantonio, TN.,
2457 Marinho, L.S.R., Thasmo, R.L.O., Koetz, J.RC., Cintra, D.M.L., Seneda, M.M.,
2458 2012. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa contagem de
2459 folículos antrais: resultados preliminares. *Acta Sci Vet.*, 40, 422.

2460

2461 Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlenhoff, U., Weibert, H.,
2462 Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., Lill, R., 2010. Humans possess two
2463 mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis,
2464 heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 107, 11775-11780.
2465 <https://doi.org/10.1073/pnas.1004250107>

2466

2467 Silva, J.R., Medeiros, C.F., Souza-Cáceres, M.B., Gheller, J.M., Silva, W.A.L.,
2468 Santos, J.V., Ferreira, M.G.C.R., Ferraz, A.L.J., Melo-Sterza, F.A., 2023
2469 Relationships between antral follicle counts and ovarian morphology of *Bos*
2470 *indicus* of different ages. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 74, 983-991.
2471 <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12650>

2472

2473 Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Koetz Junior, C., Morotti, F., Siloto, S.L.,
2474 Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C.M., Seneda, M.M.,
2475 2014. Antral follicle population and embryo production – in vitro and in vivo – of
2476 *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reproduction in*
2477 *Domestic Animals.* 49, 228-232. <https://doi.org/10.1111/rda12255>

2478

2479 Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P.,
2480 Gonçalves, P.B., Wolf, E., 2001. Mitochondrial distribution and adenosine
2481 triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation:
2482 correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro
2483 fertilization and culture. *Biol Reprod.* 64, 904-909.
2484 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>

2485

2486 Vozzi, P. A. Análise genético-quantitativa de características de precocidade
2487 sexual na raça Nelore. Tese (Doutorado em contração em genética) - Faculdade
2488 de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

2489

2490 Wang, Z., Dong, H., Yang, L., Yi, P., Wang, Q., Huang, D., 2021. The role of FDX1
2491 in granulosa cell of Polycystic ovary syndrome (PCOS). BMC Endocr Disord.
2492 21,119. DOI: 10.1186/s12902-021-00775-w

2493

2494 Xing, J., Qiao, G., Luo, X., Liu, S., Chen, S., Ye, G., Zhang, C., Yi, J., 2023.
2495 Ferredoxin 1 regulates granulosa cell apoptosis and autophagy in polycystic ovary
2496 syndrome. Clin Sci. 137, 453-468. <https://doi.org/10.1042/CS20220408>

2497

2498 Zhou, J., Lin, L., Cai, H., Liu, L., Wang, H., Zhang, J., Xia, G., Wang, J., Wang, F.,
2499 Wang, C., 2023. SP1 impacts the primordial to primary follicle transition by
2500 regulating cholesterol metabolism in granulosa cells. FASEB J. 37, e22767.
2501 <https://doi.org/10.1096/fj.202201274RR>

2502

2503 **CAPÍTULO 3**

2504

2505 Artigo 2 – A fertilidade de novilhas e primíparas precoces da raça Nelore não tem
2506 relação com a CFA e concentrações séricas de IGF-1

2507

2508 GHELLER, Janaina Menegazzo, MELO-STERZA, Fabiana de Andrade

2509

2510

2511 Resumo

2512 O objetivo desse estudo foi avaliar a taxa de gestação, as concentrações
2513 hormonais séricas e no fluido folicular, a qualidade dos oócitos e as relações
2514 dessas variáveis com a CFA. Foram utilizadas 70 novilhas Nelore, com idade
2515 média $11,5 \pm 1,3$ meses, peso médio $306,15 \pm 29,86$ kg e ECC médio $3,2 \pm 0,32$.
2516 As fêmeas foram submetidas a protocolo hormonal de pré-sincronização do ciclo
2517 estral e na sequência a um protocolo de IATF, onde receberam no D0 de 2 mg de
2518 benzoato de estradiol (Fertilcare Sincronização, MSD®, São Paulo, Brazil) e um
2519 dispositivo intravaginal com 1,2 g de progesterona (Fertilcare 1200, MSD®, São
2520 Paulo, Brazil). No D8, houve a retirada do dispositivo e administração de 0,5 mg
2521 de cloprostenol (Ciosin®, MSD, São Paulo, Brazil), 1 mg de cipionato de estradiol
2522 (Fertilcare Ovulação®, MSD, São Paulo, Brasil) e 750 UI de gonadotrofina
2523 coriônica equina (Folligon®, MSD, São Paulo, Brazil). A IATF aconteceu no D10,
2524 48 horas após o D8, e 30 dias depois foi realizado o diagnóstico de gestação
2525 (DG). Para determinar a CFA foi realizada uma única avaliação de um único
2526 ovário de cada fêmea, no D0. No ano seguinte, 33 fêmeas destas 70 foram
2527 avaliadas quanto a taxa de concepção como categoria de primíparas. Os grupos
2528 de CFA continham ≥ 13 , entre 14 e 30 e ≤ 31 folículos, para baixa, média e alta

2529 CFA, respectivamente. As fêmeas foram submetidas a OPU no D10 para coleta
2530 de oócitos e fluido folicular. Os COCs foram classificados conforme sua qualidade
2531 observando a morfologia. Foram coletadas amostras de sangue de 40 fêmeas no
2532 D10 e no DG para análise hormonal. A CFA variou entre 10 e 54, com média de
2533 $22,13 \pm 9,1$ folículos. A taxa de concepção final alcançou 43,5%, e não houve
2534 diferença entre os grupos, sendo 45,5% para baixa CFA e 41,2% para alta CFA.
2535 Não houve diferença da CFA e IGF-1 quanto a qualidade dos oócitos. A
2536 concentração sérica de IGF-1 no D10 e no DG foi maior no grupo alta CFA nos
2537 dois momentos ($P=0,0095$ e $P=0,0184$). As concentrações de IGF-1 no fluido
2538 folicular e E_2 sérico de amostras do D10, variaram entre 27 e 177 ng/mL e 0,35 e
2539 16,65ng/mL, respectivamente, e não diferiram entre os grupos de CFA. A taxa de
2540 reconcepção foi de 75%, variando entre 50 e 77,8%, para baixa e alta CFA, e não
2541 foram diferentes entre si. A análise de Correlação de Pearson mostrou correlação
2542 positiva entre as concentrações de IGF-1 no D10 e no DG com a CFA, enquanto
2543 a taxa de gestação não foi influenciada pelas concentrações de IGF-1.

2544

2545 Palavras-chave: população de folículos antrais; fertilidade; IATF; IGF-1;
2546 precocidade sexual.

2547

2548 **1. Introdução**

2549

2550 Para atender as demandas do mercado, o sistema de produção de
2551 bovinos, tem buscado a utilização de animais jovens e precoces sexualmente, por
2552 serem economicamente mais viáveis, uma vez que permanecem menos tempo na
2553 fase de recria, encurtando o ciclo de produção. Além disso, a utilização de

2554 animais jovens aumenta a velocidade de reposição do rebanho com animais de
2555 maior potencial genético, tornando o sistema cada vez mais produtivo e rentável
2556 (Jorge Junior et al., 2001; Boligon & Albuquerque, 2010; Baruselli et al., 2021).
2557 Biotecnologias da reprodução e programas de melhoramento genético tem sido
2558 ferramentas essenciais na identificação de novilhas comprovadamente mais
2559 produtivas e férteis (Barros Junior et al. 2016; Baruselli et al., 2018; Gregianini et
2560 al., 2021).

2561 A fertilidade, por sua vez, é dependente de diversos fatores intrínsecos e
2562 extrínsecos aos animais, que devem resultar na formação do embrião saudável e
2563 estabelecimento de uma gestação. A qualidade do embrião produzido, tanto *in*
2564 *vivo* quanto *in vitro*, é reflexo da qualidade dos oócitos (Lonergan et al., 2003;
2565 Sirard et al., 2003), o qual adquire competência durante o crescimento folicular
2566 (Mermillod et al., 2000) em consequência da interação entre os fatores externos e
2567 o ambiente folicular no qual está inserido (Krisher, 2013).

2568 O fluido folicular (FF) que é formado a partir do plasma e da secreção das
2569 células da granulosa e da teca no interior do folículo (Fortune, 1994), contém uma
2570 grande variedade de moléculas regulatórias que são cruciais para o sucesso da
2571 maturação dos oócitos (Wallace et al., 2012). Os principais hormônios presentes
2572 no FF são FSH, LH, hormônio de crescimento (GH), gonadotrofina coriônica
2573 humana (hCG), progesterona, estradiol, além dos hormônios metabólicos IGF-1 e
2574 insulina (Hennet e Combelles, 2012).

2575 O IGF-I pode regular o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) por meio
2576 de suas ações na hipófise através de seus efeitos sobre os hormônios
2577 hipofisários. (Hiney et al., 1996). O aumento no IGF-I plasmático no momento de
2578 elevada atividade hipotalâmica- hipofisária-gonadal, especificamente no dia do

2579 primeiro pró-estro, sugere que o IGF-I contribui para o processo puberal (Hiney et
2580 al., 1996), uma vez que elevados níveis de IGF-I foram encontrados na eminência
2581 média onde o GnRH é liberado (Hiney et al., 1991), modulando tanto a expressão
2582 quanto a liberação do GnRH (Anderson et al., 1999). Alguns estudos in vitro
2583 demonstraram que o IGF-I induziu a um aumento na liberação do LH estimulado
2584 pelo GnRH em culturas de células hipofisárias (Kanematsu et al., 1991; Soldani et
2585 al., 1995).

2586 Além disso, pesquisas demonstraram que a ação de IGF-I em grandes
2587 folículos secundários aumentou a incidência de dominância folicular e ovulação
2588 (Ginther et al., 2008). Pode-se afirmar que a composição do líquido folicular é um
2589 potencial marcador de qualidade oocitária e embrionária, pois é o reflexo do
2590 metabolismo dos folículos além de conter moléculas reguladoras que são
2591 essenciais para a maturação dos oócitos (Wallace et al., 2012).

2592 Apesar da eficiência dos métodos de dosagem de hormônios, como o IGF-
2593 1, sua aplicabilidade é limitada pelo alto custo e baixa disponibilidade de
2594 laboratórios que realizam a análise. Por isso, tem sido buscadas alternativas de
2595 aplicação mais fácil e menos onerosa, como é o caso da contagem de folículos
2596 antrais (CFA). A CFA em bovinos tem sido considerada um marcador fenotípico
2597 de fertilidade e por isso tem sido alvo de vários estudos (Burns et al., 2005;
2598 Ireland et al., 2008; Ireland et al., 2011; Pontes et al., 2011; Evans et al., 2012;
2599 Mossa et al., 2012; Baruselli et al., 2015; Silva-Santos et al., 2014; Oliveira Junior
2600 et al., 2015; Santos et al., 2016; Morotti et al., 2018; Lima et al., 2020; Gheller et
2601 al., 2023). Apesar de muitos avanços nas pesquisas, ainda há divergência entre
2602 os resultados encontrados, principalmente para animais *Bos indicus*, pois alguns
2603 mecanismos envolvidos na relação entre a CFA e a fertilidade não estão

2604 completamente elucidados (Morotti et al., 2018; Rosa et al., 2018; Lima et al.,
2605 2020).

2606 Sendo assim, para compreender os mecanismos endócrinos e encontrar
2607 ferramentas para identificação de animais mais eficientes esse trabalho teve por
2608 objetivo: a) avaliar as concentrações de IGF-1 e E₂ séricas e no fluido folicular e
2609 sua relação com a eficiência reprodutiva de novilhas Nelore precoces; b)
2610 conhecer a CFA das novilhas Nelore e a relação dessa característica com a
2611 fertilidade, qualidade oocitária e concentrações de IGF-1, E₂ e P₄, a fim de validar
2612 a CFA como um marcador para fertilidade nessa categoria animal. Atualmente
2613 não existem trabalhos que apresentem essa interação com os resultados para as
2614 fêmeas da raça Nelore.

2615

2616 **2. Material e métodos**

2617

2618 O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas da COMISSÃO
2619 DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
2620 MATO GROSSO DO SUL/UFMS, de acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro
2621 de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, aprovado sob o número
2622 1.077/2019 e pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade
2623 Estadual de Mato Grosso do Sul sob o nº 006/2021.

2624

2625 **3.1 Local e animais**

2626 O experimento foi conduzido na propriedade São Judas Tadeu, localizada
2627 no município de Anastácio no Mato Grosso do Sul, durante os anos de 2021 e
2628 2022.

2629 Foram utilizadas 73 novilhas da raça Nelore, com idade média $11,5 \pm 1,3$
2630 meses, com peso médio $306,15 \pm 29,86$ kg e ECC médio $3,2 \pm 0,32$, considerando
2631 a escala de 1 a 5 de acordo com Lowman et al. (1976). Os animais nasceram na
2632 propriedade e foram mantidas no sistema de pastejo em *Brachiara decumbens*
2633 desde então. Todos os animais pertencentes a essa fazenda são avaliados
2634 geneticamente por programas de melhoramento genético.

2635

2636 3.2 Protocolo de IATF

2637 Todas as 70 fêmeas foram submetidas a um protocolo hormonal de pré-
2638 sincronização do ciclo estral, caracterizado pela administração de progesterona
2639 injetável intramuscular (IM) (150 mg de Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brasil)
2640 em um dia aleatório do ciclo estral, sendo 24 dias antes (D-24) do início do
2641 protocolo de IATF, seguido de 1 mg de cipionato de estradiol (ECP® Zoetis, São
2642 Paulo, Brasil) após 12 dias, ou seja, no D-12.

2643 No D0 procedeu-se a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE)
2644 (Fertilcare Sincronização, MSD®, São Paulo, Brasil) i.m. e a inserção de um
2645 dispositivo intravaginal com 1,2 g de progesterona (P4) (Fertilcare 1200, MSD®,
2646 São Paulo, Brasil). No D8, o dispositivo de P4 foi removido e as fêmeas
2647 receberam 0,5 mg de cloprostenol (Ciosin®, MSD, São Paulo, Brasil), 1 mg de
2648 cipionato de estradiol (CE) (Fertilcare Ovulação®, MSD, São Paulo, Brasil) e 750
2649 UI de gonadotrofina coriônica equina (PMSG) (Folligon®, MSD, São Paulo,
2650 Brasil), todos via i.m..

2651 No ano seguinte, 33 dessas 70 fêmeas foram avaliadas quanto a taxa de
2652 reconcepção, ou seja, taxa de concepção quando elas pertenciam a categoria de

2653 primíparas. O protocolo de IATF seguiu os mesmos moldes citados no parágrafo
2654 anterior.

2655 Ao final da estação de serviço (quando novilhas e quando primíparas) foi
2656 realizado o diagnóstico de gestação (DG) por ultrassonografia transretal, com
2657 equipamento de ultrassom (SonoScape® A5 VET) acoplado a um transdutor
2658 linear de 5,0 MHz.

2659 Calculou-se a taxa de concepção (TC), pela fórmula: $TC = n^{\circ} \text{ de novilhas}$
2660 $\text{prenhes} / n^{\circ} \text{ de novilhas inseminadas} \times 100$.

2661

2662 3.3 Contagem de folículos antrais (CFA)

2663 Para determinar a CFA foi realizada uma única avaliação de um único ovário
2664 de cada fêmea, no D0 do protocolo de IATF, utilizando equipamento de ultrassom
2665 (SonoScape® A5 VET) acoplado a um transdutor linear de 5,0-MHz. Um ovário
2666 de cada fêmea foi avaliado para visualização de todos os folículos antrais $\geq 3\text{mm}$,
2667 conforme descrito por Cardoso et al. (2018). Para contar os folículos, o operador
2668 realizava uma rotação lenta de 180° para garantir que todos os folículos fossem
2669 contados uma vez. A CFA de cada animal foi determinada pela multiplicação do
2670 número encontrado por duas vezes (Oliveira Junior et al., 2015)

2671 Os grupos de CFA foram divididos em baixa, média e alta, considerando a
2672 média ± 1 desvio padrão. Dessa forma, o grupo com baixa CFA apresentou ≤ 13
2673 de folículos ($n=22$), média CFA entre 14 e 30 ($n=34$), e o grupo de alta CFA
2674 apresentou ≥ 31 folículos ($n=17$). Nas análises posteriores foram utilizadas apenas
2675 as fêmeas pertencentes aos grupos baixa e alta CFA.

2676

2677 3.4 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)

2678 As fêmeas foram submetidas a OPU no D10 do protocolo de IATF. Antes
2679 de iniciar o procedimento de OPU, cada fêmea recebeu anestesia epidural com 5
2680 ml de lidocaína a 2. O procedimento de OPU aconteceu de forma que cada
2681 folículo visualizado foi aspirado utilizando-se transdutor microconvexo de 7,5 MHz
2682 (KAIXIN®) montado em um guia de aço inoxidável. A punção folicular foi realizada
2683 utilizando agulha hipodérmica 40 x 8mm ligada a um tubo cônico plástico de 50
2684 mL por meio de equipos de silicone (0,8m, 2 mm de diâmetro). A aspiração do
2685 material foi realizada utilizando bomba de vácuo (WTA®, Watanabe, Brasil) com
2686 pressão negativa de 75 mm Hg. O meio de coleta foi solução tampão fosfato (PBS
2687 Nutricell, Campinas, SP, Brasil), com 10.000 UI/L de heparina sódica. Os
2688 complexos cúmulos oócitos recuperados foram manipulados em laboratório como
2689 descrito no próximo item.

2690

2691 3.5 Complexos cumulus oócitos (COCs) e fluido folicular

2692 Os COCs foram classificados conforme sua qualidade em grau I, II, III, IV,
2693 desnudo, expandido e degenerado (Stojovic et al., 2001).

2694 O fluido folicular restante da placa de petri foi acondicionado em eppendorf
2695 de 2 mL, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido
2696 e novamente alocado em eppendorf, sendo congelado em nitrogênio líquido e
2697 transferido para o freezer -80°C até o momento da realização das análises.

2698

2699 3.6 Amostras de soro

2700 Foram coletadas amostras de sangue de 40 fêmeas no dia da IA e no dia
2701 do DG para dosagem hormonal de estrógeno, progesterona, e IGF-1.

2702 As amostras foram mantidas em gelo até serem centrifugadas (20.000
2703 RPM) por 15 minutos e, posteriormente, até que fossem levadas ao laboratório de
2704 biotecnologias da reprodução da UEMS, onde foram armazenadas a -20 °C para
2705 posterior análise de IGF-1 e estradiol.

2706

2707 3.7 Análise hormonal

2708 As concentrações séricas e no fluido folicular de IGF-1 e estradiol foram
2709 determinadas através da utilização de Kit RIA Beckman Counter. A análise foi
2710 realizada em microplaca de 96 poços, por meio da adição de 2 µL de soro ou
2711 fluido folicular e adicionados 200 µL do reagente. Após incubação da placa por 10
2712 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490nm em leitor de ELISA
2713 (HumareaderHS 16670). O ensaio foi realizado em duplicata.

2714

2715 3.7 Análise estatística

2716 Para todas as análises, cada novilha foi considerada uma unidade
2717 experimental. Dados de CFA, concepção, folículo dominante, corpo lúteo,
2718 concentrações hormonais e qualidade de oócitos foram obtidos pelo PROC
2719 MEANS usando SAS (University Edition). As médias dos grupos de CFA foram
2720 comparadas utilizando PROC GLIMMIX SAS (University Edition).

2721 A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as taxas
2722 médias de CFA e concepção. A relação entre CFA e probabilidade de prenhez foi
2723 determinada por regressão logística usando o PROC LOGISTIC no SAS. As
2724 variáveis também foram analisadas por correlação utilizando PROC CORR.

2725 Para todas as análises, foi considerada valor estatisticamente diferente
2726 quando $P < 0,05$.

2727 3 Resultados

2728 A CFA das fêmeas Nelore variou entre 10 e 54, com média de $22,13 \pm 9,1$
2729 folículos. Dessa forma, considerando a metodologia para separação em grupo
2730 pela CFA, os grupos de baixa e alta continham ≤ 13 e ≥ 31 folículos,
2731 respectivamente. Não foram utilizadas fêmeas com número de folículos entre os
2732 grupos de baixa e alta CFA.

2733 A taxa de concepção para novilhas foi de 43,8%, sendo o grupo de baixa
2734 CFA apresentou 45,5% e o de alta 41,2%. Não houve diferença nem correlação
2735 para taxa de gestação entre os grupos (Tabela 1 e 2; Figura 1). Quando avaliadas
2736 como primíparas a taxa de concepção alcançou 42,2% para baixa CFA e 51,7%
2737 para alta CFA (Tabela 1; Figura 1), e não diferiram entre si.

2738 A concentração sérica de IGF-1, de amostras coletadas no momento da
2739 IATF e no dia do diagnóstico de gestação (DG), variou entre 140 e 515 ng/mL e
2740 229,93 e 504,84, respectivamente e apresentou diferença ($P=0,0095$ e $P=0,0184$)
2741 entre os grupos de baixa e alta CFA (Tabela 1) sendo maior no grupo de alta CFA
2742 nas duas coletas. Já as concentrações de IGF-1 no fluido folicular e E_2 sérico, de
2743 amostras coletadas no dia da IATF, variaram entre 27 e 177 ng/mL e 0,35 e 16,65
2744 ng/mL, respectivamente, e não houve diferença entre os grupos de CFA (Tabela
2745 1). Independentemente dos grupos de CFA, as concentrações de IGF1 no dia da
2746 IA e no DG não foram diferentes quando comparadas as médias gerais dos dois
2747 momentos de coleta (Tabela 1) e não influenciaram a taxa de gestação (Tabela 2;
2748 Figura 2).

2749

2750

2751

2752 Tabela 1. Taxa de concepção e reconcepção (%), e resultados da dosagem de hormônios IGF-1,
2753 E₂ e P₄ séricos e no fluido folicular de novilhas da raça Nelore.

	Média geral*	Baixa CFA	Alta CFA	Valor de P
Taxa de concepção (%)	43,8 (32/73)	45,5 (10/22)	41,2 (7/17)	>0,05
Taxa de reconcepção (%)	75 (24/33)	50 (4/8)	77,8 (7/9)	0,2884
IGF-1 S(D10) (µg/L)	329,03±73 ¹	269,228 ^a	418,726 ^b	0,0095
IGF-1 S (D40) (µg/L)	342,9±117,5 ¹	306,911 ^a	386,977 ^b	0,0184
IGF-1 FF (D10) (µg/L)	93,58±60	82,844 ^a	104,32 ^a	0,5611
E ₂ S (D10) (µg/L)	6,03±5,4	6,9165 ^a	3,8210 ^a	0,35

2754 IGF-1 sérico no dia da IATF = IGF-1 S (D10);

2755 IGF-1 sérico no dia do diagnóstico de gestação = IGF-1 S (D40);

2756 Estrógeno sérico no dia da IATF = E₂ S (D10);

2757 Progesterona sérica no dia da IATF = P₄ S (D10);

2758 IGF-1 no fluido folicular no dia da IATF = IGF-1 FF (D10).

2759 *Média geral das variáveis independente dos grupos de CFA;

2760 ¹Números diferentes na mesma coluna representam diferença estatística, considerando P<0,05.

2761 ^aLetras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos baixa e alta
2762 CFA, considerando P<0,05.

2763

2764 Não houve diferença entre a qualidade de oócitos, avaliados por sua
2765 morfologia, quanto aos grupos de CFA (P>0,05) e concentrações de IGF-1 séricas
2766 e no fluido folicular (P>0,05).

2767 Na análise de Correlação de Pearson foram encontrados resultados que
2768 reforçaram os mostrados na Tabela 1, que foi o caso da correlação significativa e
2769 positiva entre as concentrações de IGF-1 na IATF e no DG com a CFA (Tabela 2;
2770 Figura 2).

2771

2772

2773

2774 Tabela 2. Análise de Correlação de Pearson entre a taxa de concepção e resultados da dosagem
 2775 de hormônios IGF-1, E₂ e P₄ séricos e no fluido folicular de novilhas da raça Nelore.

	CFA	Taxa de concepção (%)	IGF-1 S (D10)	IGF-1 S (D40)	IGF-1 FF (D10)	E ₂ (D10)
CFA	-	0.09285 P=0.4346	0.52584 P=0.0441	0.54806 P=0.0280	0.14406 P=0.6551	0.11787 P=0.5833
Taxa de concepção (%)	0.09285 P=0.4346	-	0.16947 P=0.5460	0.22509 P=0.4019	-0.19473 P=0.5442	-0.33570 P=0.1088
IGF-1 S (D10)	0.52584 P=0.0441	0.16947 P=0.5460	-	0.67141 P=0.0061	0.77705 P=0.0049	-0.33570 P=0.1088
IGF-1 S (D40)	0.54806 P=0.0280	0.22509 P=0.4019	0.67141 P=0.0061	-	0.38979 P=0.2104	-0.33570 P=0.1088
IGF-1 FF (D10)	0.14406 P=0.6551	-0.19473 P=0.5442	0.77705 P=0.0049	0.38979 P=0.2104	-	-0.33570 P=0.1088
E₂(D10)	-0,28659 P=0,3205	0,4388 P=0,8816	0,24586 P=0,5237	-0,16177 P=0,6775	0,03745 P=0,9365	-

2776 IGF-1 sérico no dia da IATF = IGF-1 S (D10);

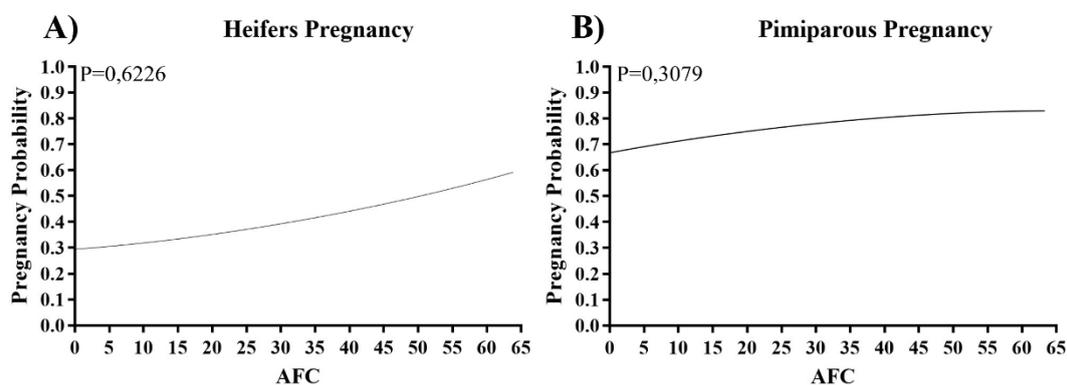
2777 IGF-1 sérico no dia do diagnóstico de gestação = IGF-1 S (D40);

2778 Estrógeno sérico no dia da IATF = E₂ S (D10);

2779 IGF-1 no fluido folicular no dia da IATF = IGF-1 FF (D10).

2780 Foram consideradas diferenças estatísticas P<0,05.

2781



2782

2783 **Figura 1.** Análise de regressão logística da probabilidade de prenhez em função da CFA para as fêmeas

2784 quando novilhas (A) e quando primíparas (B).

2785

2786
2787
2788
2789
2790
2791
2792

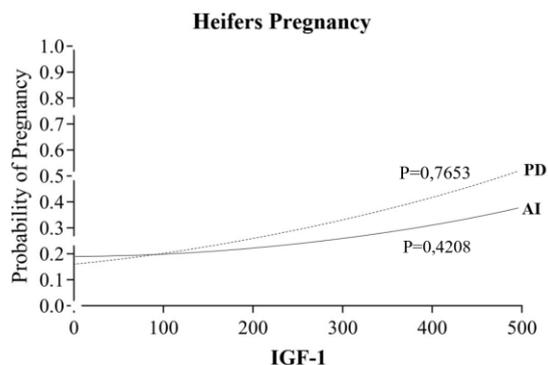


Figura 2. Análise de regressão logística da probabilidade de prenhez em função da concentração sérica de IGF-1 no dia da inseminação artificial (AI) e diagnóstico de gestação (PD).

2793
2794
2795

3. DISCUSSÃO

2796 A taxa de gestação das fêmeas desse estudo foi de 43,5%, semelhante ao
2797 relatado por Gregianni et al. (2021) com taxa de gestação 42% para novilhas
2798 Nelore entre 11-14 meses de idade. Gottschall e Silva (2018), afirmaram que taxa
2799 de gestação em novilhas jovens variaram entre 35% e 40%, assim como já foi
2800 relatado pelo nosso grupo de pesquisa por Gheller et al. (2023).

2801 Não foram encontradas diferenças e correlação significativa entre a taxa de
2802 gestação e os grupos de baixa e alta CFA. Em trabalho recente realizado com
2803 503 novilhas Nelore por Gheller et al. (2023), foi encontrada maior probabilidade
2804 de prenhez ($p < 0,0001$) quanto menor fosse a CFA. A fertilidade em fêmeas
2805 adultas da raça Nelore já foi comprovada como sendo maior à medida que a CFA
2806 diminui (Morotti et al., 2018; Pegorari et al., 2018; Moraes et al., 2019; Gheller et
2807 al., 2023). Embora não se tenham dados de herdabilidade da CFA para a raça
2808 Nelore, para animais *Bos taurus* já foram relatadas herdabilidades com valor
2809 moderado em bovinos leiteiros (entre 0,25 e 0,31) (Merton et al., 2009; Walsh et
2810 al., 2014), e alto para animais da raça Brangus (0,73) (Snelling et al. 2012), o que

2811 sugere que a fertilidade das novilhas Nelore com baixa CFA seja semelhante a
2812 encontrada pelas fêmeas adultas. No entanto, estudos que relacionam a CFA
2813 com a taxa de gestação e precocidade sexual em novilhas Nelore ainda são
2814 escassos, e os mecanismos envolvidos precisam ser melhor esclarecidos.

2815 A taxa de gestação das fêmeas primíparas em estudo alcançou a média de
2816 50 e 77,8% para baixa e alta CFA, respectivamente, e está de acordo com o
2817 relatado por Meneghetti e Vasconcelos (2008). Sabe-se que a categoria das
2818 fêmeas primíparas apresenta maiores dificuldades para retornar à ciclicidade
2819 ovariana pós-parto (Mossman e Hanly, 1977), isso é consequência da alta
2820 demanda energética que esses animais precisam para a manutenção,
2821 crescimento e amamentação. Por esses motivos, o retorno da fêmea à atividade
2822 reprodutiva pós-parto é prejudicado, aumentando o período de serviço e o
2823 intervalo de partos. Esse é o primeiro relato da literatura que traz dados de
2824 reconcepção de novilhas Nelore precoce, na sua segunda IATF. Apesar disso,
2825 não houve diferença entre a taxa de concepção para o grupo de baixa e alta CFA.

2826 No presente trabalho não foram encontradas diferenças e correlação entre
2827 a qualidade de oócitos e a CFA. A qualidade oocitária, assim como a quantidade
2828 de oócitos recuperados, está diretamente relacionada com a qualidade do
2829 embrião produzido. Existem muitos relatos que descrevem maior número de
2830 oócitos coletados quando as fêmeas doadoras apresentam maior CFA e,
2831 consequentemente, há maior número de embriões produzidos *in vitro* (Ireland et
2832 al., 2007, 2008; Silva -Santos et al., 2014; Santos et al., 2016). No entanto, há
2833 inconsistências nos resultados referentes as taxas de recuperação de oócitos e à
2834 proporção de embriões produzidos *in vitro* de fêmeas com baixa e alta CFA (Silva-
2835 Santos et al., 2014; Nagai et al., 2016; Monteiro et al., 2017). No estudo de Garcia

2836 et al. (2020) que utilizou fêmeas da raça Nelore, o número total de oócitos e
2837 embriões produzidos foi maior para fêmeas com alta CFA, enquanto as taxas de
2838 recuperação de oócitos e desenvolvimento embrionário até o estágio de
2839 blastocisto não diferiram. Este achado indica que a contagem de folículos
2840 influencia no número total de oócitos, no entanto há controvérsias quanto a taxa
2841 de desenvolvimento de embriões produzidos através da fertilização *in vitro* entre
2842 fêmeas com diferentes CFAs (Ireland et al., 2007; Silva-Santos et al., 2014;
2843 Santos et al., 2007; Silva-Santos et al., 2014; Santos et al., 2016; Monteiro et al.,
2844 2017; Rosa et al., 2018; Garcia et al., 2020).

2845 Assim como a CFA, as concentrações de IGF-1 séricas e no fluido folicular
2846 não influenciaram a taxa de gestação. Já foi comprovado que o IGF-I estimula a
2847 maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário em bovino
2848 (Matsui et al., 1997; Palma et al., 1997), pois modula a capacidade de resposta
2849 das células ovarianas às gonadotrofinas, estimulando a mitose celular, o
2850 crescimento folicular e a esteroidogênese (Spicer e Stewart, 1996; Stewart et al.,
2851 1996; Armstrong et al., 2003). In vivo, o IGF-1 está presente no fluido folicular
2852 (Spicer e Echterkamp, 1995), em secreções uterinas (Geisert et al., 1991) e tuba
2853 uterina (Schmidt et al., 1994), fornecendo um ambiente rico em IGF-1 para o
2854 oócito e embrião (Watson et al, 1999). Quanto à maturação *in vitro*, Herrler et al.
2855 (1992) demonstraram que a adição de IGF- 1 ao meio de maturação melhorou a
2856 qualidade dos embriões bovinos e aumentou a taxa de produção de blastocistos
2857 (Markkula e Makarevich, 2001). A adição IGF-1 ao meio de cultivo de embriões
2858 bovinos estimulou a proporção de oócitos que se desenvolveram ao estágio de
2859 blastocisto, além de acelerar a taxa de desenvolvimento embrionário (Moreira et
2860 al., 2002). Entretanto, no presente estudo não foi encontrada relação entre a CFA

2861 e IGF-1 com a qualidade morfológica dos oócitos provenientes de novilhas
2862 Nelore.

2863 A concentração sérica de IGF-1 foi maior ($p > 0,05$) para as fêmeas com
2864 alta CFA, em ambos os momentos avaliados (dia da IA e dia do diagnóstico de
2865 gestação), sendo confirmada por correlação positiva com $r = 0,52$ e $r = 0,54$,
2866 respectivamente. Assim como o resultado encontrado nesse trabalho, há
2867 evidências de que as concentrações de alguns fatores locais ovarianos, como o
2868 IGF-1, sejam diferentes entre animais com diferentes populações de folículos
2869 antrais, ao comparar fêmeas zebuínas e taurinas (Segerson et al., 1984; Buratini
2870 et al., 2000; Batista et al., 2014). Por exemplo, vacas Brahman apresentam
2871 maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 e menores concentrações
2872 plasmáticas de FSH do que vacas Angus (Alvarez et al., 2000; Simpson et al.,
2873 1994), o que permite inferir que o maior número de folículos em vacas Brahman,
2874 mesmo com menores concentrações de FSH, seja devido às altas concentrações
2875 de IGF-1. Nesse sentido, Bastos et al. (2010) observaram que fêmeas *Bos indicus*
2876 apresentavam maior número de folículos do que as *Bos taurus* ($42,7 \pm 5,9$ vs.
2877 $19,7 \pm 3,2$), assim como Alvarez et al. (2000), Carvalho et al. (2008), Gimenes et
2878 al. (2008) e Batista et al. (2014) encontraram. Embora o presente trabalho não
2879 compare CFA entre raças, os valores encontrados para baixa e alta CFA podem
2880 ser representados pela média de folículos encontrados para animais de origem
2881 taurina e zebuína, respectivamente. Assim, nosso trabalho está de acordo com os
2882 citados anteriormente, ao demonstrar que fêmeas com alta CFA apresentaram
2883 maiores concentrações séricas de IGF-1.

2884 A circulação do IGF-I durante o início da gestação já foi positivamente
2885 associada ao sucesso da gravidez, estimulando o desenvolvimento embrionário e

2886 a secreção de interferon-tau (Moreira et al., 2000; Wettemann e Bossis, 2000;
2887 Bilby et al., 2006). No entanto, também foram encontrados relatos que o IGF-I
2888 excessivo durante o início da gestação pode ser prejudicial ao sucesso da
2889 gravidez (Bilby et al., 2004; Cooke et al., 2007; Peres et al., 2021). Em
2890 camundongos, foi demonstrado que o IGF-I circulante em excesso regula
2891 negativamente seu receptor no blastocisto, diminuindo a captação de glicose e
2892 desencadeando apoptose (Chi et al., 2000). Em bovinos leiteiros, o IGF-I
2893 circulante excessivo durante o início da gestação acelerou o crescimento do
2894 concepto de uma maneira que causou um ambiente uterino assíncrono levando à
2895 perda da gravidez (Bilby et al., 2004; Guzeloglu et al., 2004).

2896 Concluimos que, nas condições deste experimento, há correlação positiva
2897 entre CFA e concentração sérica de IGF-1. Embora tenham sido encontradas
2898 maiores concentrações de IGF-1 no grupo com alta CFA, a CFA não interferiu na
2899 taxa de gestação de novilhas Nelore. Com isso não encontramos relação da CFA
2900 com a qualidade oocitária, nem mesmo com a precocidade sexual dessas fêmeas
2901 desafiadas a primeira IATF com idade média de 11,5 meses. Concordamos que,
2902 de fato, um trabalho de campo com maior número de fêmeas nulíparas e
2903 primíparas precisa ser realizada, no entanto, uma informação relevante é que a
2904 taxa de reconcepção das fêmeas expostas a primeira IATF quando muito jovens,
2905 não alterou em função da CFA, o que nos permite inferir que, selecionar fêmeas
2906 com alta CFA para produção de embriões, por exemplo, não influencia no
2907 sucesso da primeira e segunda IATF das fêmeas Nelore.

2908

2909

2910 **Referências bibliográficas**

2911 Alvarez, P., Spicer, L.J., Chase, C.C. Jr., Payton, M.E., Hamilton, T.D., Stewart,
2912 R.E., Hammond, A.C., Olson, T.A., Wettemann, R.P., Ovarian and endocrine
2913 characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a
2914 subtropical environment. *J Anim Sci.* 78, 1291-1302.
2915 <https://doi.org/10.2527/2000.7851291x>

2916

2917 Anderson, R.A., Zwain, I.H., Arroyo, A., Mellon, P.L., Yen, S.S., 1999. The insulin-
2918 like growth factor system in the GT1-7 GnRH neuronal cell line.
2919 *Neuroendocrinology.* 70, 353-359. <https://doi.org/10.1159/000054496>

2920

2921 Armstrong, D.G., Gong, J.G., Webb, R., 2003. Interactions between nutrition and
2922 ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod*
2923 *Suppl.* 61, 403-414.

2924

2925 Barros Junior, C.P., Borges, L.S., Sousa, P.H.A.A., Oliveira, M.R.A., Cavalcante,
2926 D.H., Andrade, T.V., Barros, C.D., Sousa Junior, S.C., 2016. Melhoramento
2927 genético em bovinos de corte (*Bos indicus*). *Nutritime Revista Online.* 13, 4558-
2928 4564.

2929

2930 Baruselli, P.S., 2021. Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões
2931 de procedimentos. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução*
2932 *Animal/FMVZ/USP, 5a ed., 2021. Acesso [http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-](http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/)*
2933 *vra/*

2934

2935 Baruselli, P.S., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Souza, A.H., 2015. Relationship
2936 between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal*
2937 *Reproduction*. 12, 487-497.

2938

2939 Batista, E.O., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M.D., Sá Filho, M.F., Del Valle,
2940 T.A., Jesus, E.F., Lopes, R.N., Rennó, F.P., Baruselli, P.S., Plasma antimüllerian
2941 hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus*
2942 (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim*. 49, 448-452.
2943 <https://doi.org/10.1111/rda.12304>

2944

2945 Bilby, T.R., Guzeloglu, A., Kamimura, S., Pancarci, S.M., Michel, F., Head, H.H.,
2946 Thatcher, W.W., Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I.
2947 Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci*.
2948 87, 3256-3267. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73462-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73462-1)

2949

2950 Bilby, T.R., Sozzi, A., Lopez, M.M., Silvestre, F.T., Ealy, A.D., Staples, C.R.,
2951 Thatcher, W.W., 2006. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty
2952 acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and growth hormone-insulin-
2953 like growth factor system responses. 89, 3360-3374.
2954 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72373-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72373-6)

2955

2956 Boligon, A. A. Albuquerque, L. G., 2011. Correlações genéticas entre escores
2957 visuais e características reprodutivas em bovinos Nelore usando inferência
2958 bayesiana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 45, 1412-1418.
2959 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001200011>

2960

2961 Buratini, J. J., Price, C.A., Visintin, J.A., Bó, G.A., 2000. Effects of dominant follicle
2962 aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian
2963 follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*. 54, 421-
2964 431. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00359-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00359-9)

2965

2966 Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005,
2967 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high
2968 variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse
2969 association with serum follicle- stimulating hormone concentrations. *Biology of*
2970 *Reproduction*. 73, 53-62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>

2971

2972 Carvalho, J.B., Carvalho, N.A., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S.,
2973 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos*
2974 *indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 69,
2975 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.035>

2976

2977 Chi, M.M., Schlein, A.L., Moley, K.H., 2000. High insulin-like growth factor 1 (IGF-
2978 1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-
2979 regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology*. 141, 4784-4792.
2980 <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7816>

2981

2982 Cooke, R.F., Arthington, J.D., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Lamb, G.C., 2007.
2983 Effects of supplement type on performance, reproductive, and physiological

2984 responses of Brahman-crossbred females. *J Anim Sci.* 85, 2564-2574.
2985 <https://doi.org/10.2527/jas.2006-684>

2986

2987 Evans, A.C.O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland,
2988 J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J., 2012. Effects of maternal environment during
2989 gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine
2990 offspring. *Reproduction in Domestic Animals.* 47, 31–37.
2991 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>

2992

2993 Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals.
2994 *Biology of Reproduction.* 50, 225-232. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>

2995

2996 Geisert, R.D., Lee, C.Y., Simmen, F.A., Zavy, M.T., Fliss, A.E., Bazer, F.W.,
2997 Simmen, R.C.M., 1991 Expression of messenger RNAs encoding insulin-like
2998 growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine
2999 endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of*
3000 *Reproduction.* 45, 975–983. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.6.975>

3001

3002 Gheller, J. M., Silva, G. C., Silva, W. A. L., Silva, A. F., Costa Filho, L. C. C.,
3003 Nogueira, E., Melo-Sterza, F. A., 2023. Antral follicle count classification selects
3004 fertile heifers without influencing the carcass traits. *Semina: Ciências Agrárias.* 44,
3005 85-96. DOI: 10.5433/1679-0359.2022v44n1p85

3006

3007 Gimenes, L.U., Sá Filho, M.F., Carvalho, N.A., Torres-Júnior, J.R., Souza, A.H.,
3008 Madureira, E.H., Trinca, L.A., Sartorelli, E.S., Barros, C.M., Carvalho, J.B.,

- 3009 Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S., 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in
3010 *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 69, 852-858.
3011 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001>
3012
- 3013 Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., Intrafollicular effect of IGF1 on
3014 development of follicle dominance in mares. *Anim Reprod Sci*. 105, 417-23.
3015 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.007>
3016
- 3017 Gregianini, H. A. G., Carneiro Junior, J. M., Neto, A. P., Costa Filho, L. C. C.,
3018 Gregianini, J. T. F., Pinheiro, A. K., Trenkel, C. K. G., 2021. Precocidade sexual de
3019 novilhas Nelore em rebanho sob seleção no Estado do Acre. *Research, Society*
3020 *and Development*. 10, e16310413945. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13945>
3021
- 3022 Guzeloglu, A., Bilby, T.R., Meikle, A., Kamimura, S., Kowalski, A., Michel, F.,
3023 MacLaren, L.A., Thatcher. W.W., 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in
3024 nonlactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of
3025 pregnancy. *J Dairy Sci*. 87, 3268-3279. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73463-3)
3026 [0302\(04\)73463-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73463-3)
3027
- 3028 Hennes, M. L., Combelles, C.M.m 2012. The antral follicle: a microenvironment for
3029 oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*. 56, 819-31. doi: 10.1387/ijdb.120133cc
- 3030 Herrler, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., 1992. Effects of insulin-like growth
3031 factor-I on in-vitro production of bovine embryos. 37, 1213-1224.
3032 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90177-S](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90177-S)
3033

3034 Hiney, J.K., Ojeda, S.R., Dees, W.L., 1991. Insulin-like growth factor I: a possible
3035 metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology*.
3036 54, 420-423. <https://doi.org/10.1159/000125924>

3037

3038 Hiney, J.K., Srivastava, V., Nyberg, C.L., Ojeda, S.R., Dees, W.L., 1996. Insulin-
3039 like growth factor-1 of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of
3040 female puberty. *Endocrinology*. 137, 3717–3728.
3041 <https://doi.org/10.1210/endo.137.9.8756538>

3042

3043 Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W.,
3044 Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within
3045 individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the
3046 proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human*
3047 *Reproduction*. 22, 1687-1695. <http://dxdoiorg/101093/humrep/dem071>

3048

3049 Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F.,
3050 Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J., 2008, Antral
3051 follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
3052 follicles in ovaries of Young adult cattle. *Biology of Reproduction*. 79, 1219-1225.
3053 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>

3054

3055 Jorge Junior, J.; El Faro, L., Albuquerque, L.G., 2001. Estimativas de
3056 herdabilidade para os escores visuais de conformação, precocidade e
3057 musculatura, em um rebanho da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA

3058 SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. Anais...
3059 Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 618-619.

3060

3061 Kanematsu, T., Irahara, M., Miyake, T., Shitsukawa, K., Aono, T., 1991. Effect of
3062 insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-
3063 pituitary axis in vitro. Acta Endocrinol. 125, 227-33.
3064 <https://doi.org/10.1530/acta.0.1250227>

3065

3066 Krisher, R.L., 2013. In Vivo and In Vitro Environmental Effects on mammalian Oocyte
3067 Quality. Annual Review of Animal Biosciences. 1,393–417.
3068 <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103647>

3069

3070 Lima, M.A., Morotti, F., Bayeux, B.M., Rezende, R.G., Botigeli, R.C., Bem, T.H.C.,
3071 Fontes. P.K., Nogueira, M.F.G., Meirelles, F.V., Baruselli, P.S., Silveira, J.C.,
3072 Perecin, F., Seneda, M.M., 2020.. Ovarian follicular dynamics, progesterone
3073 concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus*
3074 females with a high or low antral follicle count. Sci Rep. 10, 19557.
3075 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>

3076

3077 Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Farin T, Boland MP. Oocyte and embryo
3078 quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.
3079 Reproduction Domestic Animal 2003; 38:259-267. [https://doi.org/10.1046/j.1439-](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x)
3080 [0531.2003.00437.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x)

3081

3082 Lowman, B. G., Scott, N. A., Somerville, S., 1976. Condition scoring of cattle.
3083 Edinburgh. School of Agriculture. 6.

3084

3085 Markkula, M., Makarevich, A., 2021. Insulinlike growth factor I increases the ratio
3086 of proliferating cell nuclear antigen positive cells of in vitro produced bovine
3087 embryos. *Theriogenology*, 55, 432.

3088

3089 Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kanagawa, H., 1997. Stimulation of the
3090 development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is
3091 mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology*. 48, 605-616.
3092 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00277-X)

3093

3094 Meneghetti, M., Vasconcelos, J.L.M., 2008 Mês de parição, condição corporal e
3095 resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte
3096 primíparas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 786- 793.
3097 <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000400002>

3098

3099 Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R., Meijer, L., 2000. High developmental
3100 competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 h
3101 culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and*
3102 *Development*. 55,89–95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M)
3103 [2795\(200001\)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M)

3104

3105 Merton, J.S., Ask, B., Onkundi, D.C., Mullaart, E., Colenbrander, B., Nielen, M,
3106 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a

3107 bovine ovum pick-up-in vitro production embryo-production program.
3108 Theriogenology. 72, 885-893. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.003>
3109
3110 Monteiro, F.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Bayeux, B.M., Accorsi, M.,
3111 Campanholi, S.P., Dias, E.A.R., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2017. Beef donor
3112 cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared
3113 with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions.
3114 Theriogenology. 90, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>
3115
3116 Moraes, F.L.Z., Morotti, F., Costa, C.B., Lunardelli, PA., Seneda, M. M. 2019.
3117 Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates
3118 after timed-AI in Bos indicus cattle. Theriogenology. 36, 10-14.
3119 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.024>
3120
3121 Moreira, F., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J., Badinga, L., Thatcher, W.W., 2002.
3122 Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in
3123 vitro derived bovine embryos. Theriogenology. 57, 895-907.
3124 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00694-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00694-X)
3125
3126 Moreira, F., Risco, C.A., Pires, M.F., Ambrose, J.D., Drost, M., Thatcher, W.W.,
3127 2000. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial
3128 insemination. 83, 1237-1247. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74990-3
3129
3130 Morotti, F., Moretti, R., Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Cerqueira, P.H.R.,
3131 Seneda, M. M., 2018. Ovarian follicular dynamics and conception rate in Bos

3132 indicus cows with different antral follicle counts subjects to timed artificial
3133 insemination. *Animal Reproduction Science*. 188, 170-177.
3134 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001>

3135

3136 Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan,
3137 P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian
3138 follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of*
3139 *Dairy Science*. 95, 2355-2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>

3140 Mossman, D.H., Hanly, G.J., 1977. A theory of beef production. *N. Z. Vet. J.* 25,
3141 96-100. <https://doi.org/10.1080/00480169.1977.34370>

3142

3143 Nagai K., Yanagawa Y., Katagiri S., Nagano M., 2016. The relationship between
3144 antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-
3145 grown oocytes derived from early antral follicles. *Biomed. Res.* 37, 63–71.
3146 <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.63>

3147

3148 Oliveira Junior, J.S., Cardoso, C.J.T., Silva, W.A.L., Kischel, H., Souza, M.B.,
3149 Andrade, E.R., Nogueira, E., Silva-Santos, K.C., Seneda, M.M., Melo-Sterza, F.A.,
3150 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando
3151 breeds. *Semina: Ciências Agrárias*. 36, 3741-3750.

3152 Palma, G.A., Argañaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.Á., Sinowatz, F.,
3153 2012. Biology and biotechnology of follicle development. *Scientific World Journal*.
3154 2012,938138. <https://doi.org/10.1100/2012/938138>

3155

3156 Pegorari, L. A. R., Jr., Seugling, G. H. F., Negreiros, M. P. M., Vicentin, G. R.,
3157 Silva, G. C., Kairuz, J. G. R., Pereira, A. C. B., Blaschi, W., Barreiros, T. R. R.
3158 2018. Effect of cyclicity, body condition score and antral follicle count on the
3159 conception rate of Nelore cows submitted to fixed-time artificial insemination.
3160 *Animal Reproduction*. 15, 339-340.

3161

3162 Peres, R.F.G., Cooke, R.F., Dias, H., Keisler, D. H., Pohler, K. G., Vasconcelos,
3163 J.L.M., 2021. Relationship among serum metabolic hormones with pregnancy
3164 rates to fixed-time artificial insemination in *Bos indicus* beef females, *Livestock*
3165 *Science*. 245, 104451, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104451>

3166

3167 Pontes, J.H.F., Melo-Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V.,
3168 Rubin, K.C.P., Seneda, M.M., 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
3169 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore Cattle (*Bos*
3170 *indicus*) donor. *Theriogenology*. 75, 1640-1646.
3171 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>

3172

3173 Schmidt, A., Einspanier, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Schams, D.,
3174 Expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the bovine oviduct during the
3175 oestrous cycle. *Exp Clin Endocrinol*. 102, 364-369. DOI: 10.1055/s-0029-1211305

3176

3177 Segerson, E.C., Hansen, T.R., Libby, D.W., Randel, R.D., Getz, W.R., 1984.
3178 Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J*
3179 *Anim Sci*. 59, 1026-1046. <https://doi.org/10.2527/jas1984.5941026x>

3180

3181 Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Koetz Junior, C., Morotti, F., Siloto, S.L.,
3182 Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C.M., Seneda, M.M.,
3183 2014. Antral follicle population and embryo production – in vitro and in vivo – of
3184 *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reproduction in*
3185 *Domestic Animals*. 49, 228-232. <https://doi.org/10.1111/rda12255>

3186

3187 Sirard, M.A., Dufort, I., Coenen, K., Tremblay, K., Assicotte, L., Robert, C., 2003.
3188 The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo
3189 functions in farm animals. *Reproduction Supplement*. 61, 117-129. PMID:
3190 14635931

3191

3192 Snelling, W.M., Cushman, R.A., Fortes, M.R.S., Reverter, A., Bennett, G.L., Keele,
3193 J.W., Kuehn, L.A., McDanel, T.G., Thallman, R.M., Thomas, M.G., 2012. How
3194 single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors
3195 controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. *Journal of*
3196 *Animal Science*. 90, 1152-1165. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4581>

3197

3198 Soldani, R., Cagnacci, A., Paoletti, A.M., Yen, S.S., Melis, G.B., 1995. Modulation
3199 of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing
3200 hormone by insulin-like growth factor I in vitro. *Fertil Steril*. 64, 634-637.
3201 [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57804-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57804-2)

3202

3203 Spicer, L.J., Echternkamp, S.E., 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth
3204 factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*.
3205 12, 223-245. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0739-7240(95)00021-6)

3206 Spicer, L.J., Stewart, R.E., 1996. Interaction among bovine somatotropin, insulin,
3207 and gonadotropins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. J
3208 Dairy Sci. 1996, 79, 813-821. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76429-9

3209

3210 Stewart, R.E., Spicer, L.J., Hamilton, T.D., Keefer, B.E., Dawson, L.J., Morgan,
3211 G.L., Echterkamp, S.E., 1996. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding
3212 proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant
3213 follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles.
3214 Endocrinology. 137, 2842-2850. <https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770905>

3215

3216 Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P.,
3217 Gonçalves, P.B., Wolf, E., 2001. Mitochondrial distribution and adenosine
3218 triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation:
3219 correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro
3220 fertilization and culture. Biol Reprod. 64, 904-909.
3221 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>

3222

3223 Wallace, M., Cottell, E., Gibney, M.J., McAuliffe, F.M., Wingfield, M., Brennan, L.,
3224 2012. An investigation into the relationship between the metabolic profile of
3225 follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. Fertil
3226 Steril, 97. 1078-1084. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.122>

3227

3228 Wallace, M., Cottell, E., Gibney, M.J., McAuliffe, F.M., Wingfield, M., Brennan, L.,
3229 2012. An investigation into the relationship between the metabolic profile of

3230 follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil*
3231 *Steril.* 97, 1078-1084. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.122>

3232

3233 Walsh, S.W., Mossa, R., Butler, S.T., Berry, D.P., Scheetz, D., Jimenez-Krassel,
3234 F., Tempelman, R.J., Carter, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2014.

3235 Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle

3236 count in cattle. *Journal of Dairy Science.* 97, 1-9. <https://doi.org/10.3168/jds.2013->

3237 7758

3238

3239 Watson, A.J., Westhusin, M.E., Winger, Q.A., 1999. IGF paracrine and autocrine
3240 interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl.* 54, 303-315.

3241 PMID: 10692863

3242

3243 Wettemann, P., Bossis, I. Energy Intake Regulates Ovarian Function in Beef

3244 Cattle, *Journal of Animal Science.* 77, 1–10. <https://doi.org/10.2527/jas2000.77E->

3245 Suppl1c

CONCLUSÃO GERAL

3246

3247

3248 A realização desse trabalho de pesquisa colaborou para maior
3249 compreensão da relação da contagem de folículos antrais como o desempenho
3250 reprodutivo de novilhas da raça Nelore e cruzadas Nelore x Angus. Foi possível
3251 conhecer a população de folículos, e algumas características genéticas e
3252 fisiológicas envolvidas na CFA.

3253

3254

3255

3256

3257

3258

3259

3260

3261

3262

3263

3264

Em ambos os trabalhos (artigo 1 e 2) não foram encontradas diferenças na taxa de concepção entre os grupos de CFA. No entanto, o artigo 1 nos traz revelações importantes a respeito da CFA com a fertilidade. Nele observamos que diversos genes diferentemente expressos e positivamente regulados no grupo baixa CFA estão relacionados a eventos contrários a fertilidade. Além disso, um dos poucos genes que foi negativamente regulado nesse grupo tem relação positiva com a fertilidade. Ou seja, no contexto da produção de embriões, podemos optar por fêmeas Nelore x Angus com alta CFA, sugerindo maior número de embriões produzidos em consequência do maior número de oócitos capturados, sem que haja prejuízos a fertilidade da fêmea e da sua próxima geração, uma vez que já foi relatada alta herdabilidade (0,73) da CFA para a raça Brangus.

3265

3266

3267

3268

3269

3270

3271

3272

3273

3274

Além disso, no artigo 2 demonstramos haver relação da concentração de IGF-1 com a CFA, sendo essa maior quanto maior for a população de folículos antrais. Essa relação ainda não havia sido relatada na literatura e nos traz informações importantes, uma vez que já é conhecida a importância do IGF-1 nos processos reprodutivos, enquanto a relação da CFA com a fertilidade ainda está sendo estudada. No entanto, essa relação precisa ser melhor estudada, uma vez que o objetivo do nosso grupo de pesquisa é encontrar um modelo de seleção para fertilidade baseado na CFA, desde que essa característica não influencie negativamente a fertilidade e capacidade produtiva das fêmeas e suas futuras gerações.

3275

3276

3277

3278

3279

Por isso, considerando a intensidade da pressão de seleção por animais mais férteis dentro dos rebanhos, acreditamos que a CFA tem um grande potencial para se tornar um parâmetro de seleção de fácil e rápida aplicação, desde que seus efeitos sejam conhecidos e haja maior acurácia das informações disponibilizadas.

IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL E TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO3280
3281

3282 A contagem de folículos antrais (CFA) tem sido utilizada como uma forma
3283 de seleção para fêmeas, principalmente no que diz respeito as doadoras de
3284 oócitos, uma vez que o número de embriões produzidos tem relação com o
3285 número de oócitos coletados durante o procedimento de aspiração folicular. No
3286 entanto, estudos recentes têm demonstrado que a CFA pode influenciar no
3287 desempenho reprodutivo das fêmeas, seja em programas de IATF, produção e
3288 transferência de embriões. Dessa forma, a realização do estudo proposto
3289 demonstrou como a CFA pode influenciar nos processos reprodutivos, sendo um
3290 potencial marcador fenotípico para escolha de animais mais férteis. Selecionar
3291 animais mais férteis e produtivos tem grande impacto econômico, uma vez que
3292 com a pressão de seleção os intervalos entre gerações estão cada vez mais
3293 curtos, ou seja, animais melhorados e melhoradores estão sendo introduzidos nos
3294 rebanhos mais rapidamente e com maior acurácia nos resultados. Dessa forma,
3295 além do impacto econômico podemos observar que toda a sociedade envolvida é
3296 beneficiada, pois o produto final a ser entregue ao consumidor será de melhor
3297 qualidade e com garantia de origem, atendendo as exigências do mercado
3298 consumidor.