

GLAUCO BARRA VILLELA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM UM
PROGRAMA COMERCIAL E MORFOMETRIA DE ORGÃOS GENITAIS DE
DOADORAS GIR LEITEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Domingos Guimarães

Coorientador: Victor Enrique Gomez Leon

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V735a
2021

Villela, Glauco Barra, 1995-
Avaliação da produção *in vitro* de embriões em um
programa comercial e morfometrias de órgãos genitais de
doadoras Gir Leiteiro / Glauco Barra Villela. – Viçosa, MG,
2021.

1 dissertação eletrônica (69 f.): il.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.002>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Oócitos. 2. Vacas - Reprodução. 3. Fecundidade.
I. Guimarães, José Domingos, 1963-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22.ed. 636.2089165

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523


GLAUCO BARRA VILLELA

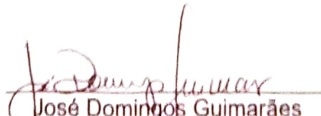
**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM UM
PROGRAMA COMERCIAL E MORFOMETRIA DE ORGÃOS GENITAIS DE
DOADORAS GIR LEITEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2021

Assentimento:


Glauco Barra Villela
Autor


José Domingos Guimarães
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar, por me dar força, coragem e motivação para realização deste trabalho.

Aos professores que sempre estiveram dispostos a me orientar e me motivar, em especial ao meu orientador JD, ao meu co-orientador Victor e à professora Simone.

Aos meus amigos e colegas que me apoiaram durante esta jornada, que tornaram os momentos de desespero em alegria e boas risadas, em especial à equipe da reprodução.

Ao Jura e ao Edgar, por me auxiliarem descomplicando a estatística.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para me permitir a realização dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas durante a pós-graduação.

Aos funcionários do departamento de veterinária da UFV, em especial à Rosi pelo acolhimento e orientação, e ao Adão e Cláudio pela disposição em ajudar.

Ao Luiz Fernando, Simeão e todo pessoal das fazendas do BASA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

VILLELA, Glauco Barra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Avaliação da produção *in vitro* de embriões em um programa comercial e morfometria de órgãos genitais de doadoras Gir leiteiro.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientador: Victor Enrique Gomez Leon.

Avaliou-se a eficiência da produção *in vitro* de embriões Girolando F1 (*Bos primogenitus taurus* x *Bos primogenitus indicus*) e o número de oócitos aspirados de fêmeas Gir Leiteiro (*Bos primogenitus indicus*) classificadas como baixa, intermediária ou alta doadora de oócitos. Total de 473 registros de aspirações foliculares guiadas por ultrassom para produção *in vitro* de embriões de 255 doadoras. Analisou-se a probabilidade de clivagem e a probabilidade de obtenção de embrião de acordo com o número de oócitos recuperados por doadora, o número de embriões obtidos quando as fêmeas foram divididas em quartis de baixo (<15, B-MTOA), intermediário (entre 15 e 33, sendo agrupados os dois quartis intermediários, I-MTOA) ou alto (>34, A-MTOA) número de oócitos aspirados. As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett para verificação de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias, respectivamente. O total de oócitos recuperados foi 11.815 em 468 procedimentos de OPU analisados, sendo a média do número de oócitos recuperados por doadora de $25,1 \pm 13,4$. As médias do número oócitos recuperados para os animais foram $10,86 \pm 0,30$, $23,47 \pm 0,32$ e $44,84 \pm 1,03$ para os grupos B-MTOA, I-MTOA e A-MTOA, respectivamente. A análise de regressão logística mostrou aumento na probabilidade de se obter embriões de acordo com o aumento do número de oócitos recuperados. Na segunda etapa foram coletados órgãos genitais de 26 fêmeas para avaliação morfométrica de ovários, tuba uterina e útero. Os animais foram divididos em classes de idades (<56, de 56 a 90 e >91 meses), status (anestro, ciclando, gestante), contagem de folículos antrais (CFA; <15, de 15 a 33 folículos e >34 folículos) e total de oócitos aspirados (TOA; <15, de 15 a 33 ócitos e >34 oócitos). As classes foram analisadas considerando as seguintes variáveis: idade, largura do ovário direito, espessura do ovário direito, comprimento do ovário direito, volume do ovário direito, peso do ovário direito, número de folículos contados no ovário direito, largura do ovário esquerdo, espessura do ovário esquerdo, comprimento do ovário esquerdo, volume do ovário esquerdo, número de folículos contados no ovário

esquerdo, total de folículos contados nos dois ovários, comprimento e peso da tuba uterina direita, comprimento e peso da tuba uterina esquerda, comprimento dos cornos uterinos direito e esquerdo, número de aspirações, média do total de oócitos aspirados, média do total de oócitos viáveis, média do número de embriões produzidos, total de embriões viáveis/OPU, total de embriões transferidos/OPU, número total de embriões obtidos\doadora, número total de prenhez obtida após transferência dos embriões. Para os parâmetros quantitativos, os valores obtidos foram testados quanto a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors e a homocedasticidade das variâncias pelos testes de Cochran e Bartlett. Foi realizada correlação simples de Pearson para as variáveis quantitativas. O comprimento do ovário direito foi maior para animais com idade superior, enquanto o comprimento do ovário esquerdo foi significativamente maior apenas para animais com maior idade com relação a animais de idade intermediária. Houve moderada correlação negativa entre o número de folículos presentes nos ovários e a idades dos animais.

Palavras-chave: Oócito. Vacas. Reprodução. Fecundidade.

ABSTRACT

VILLELA, Glauco Barra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2021. **Assessment of the in vitro production of embryos in a commercial program and morphometry of genital organs of Gir donors.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-Adviser: Victor Enrique Gomez Leon.

Evaluation of the efficiency of the *in vitro* production of Girolando F1 embryos (*Bos primogenitus taurus* x *Bos primogenitus indicus*) and the number of aspirated oocytes of Gir Leiteiro (*Bos primogenitus indicus*) females classified as low, intermediate or high oocyte gilding. Total of 473 records of follicular aspiration guided by ultrassom for in vitro production of embryos from 255 donors. Analysis of the probability of cleavage and the probability of obtaining embryo according to the number of oocytes recovered per doadora, or the number of embryos obtained when the females are divided into quartis of lower (<15, L-OR), intermediate (between 15 and 33, being grouped two intermediate quartis, I-OR) or high (> 34, H-OR) number of aspirated oocytes. Thus, several quantitative forms are submitted to the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests to verify normality of two errors and homogeneity of variances, respectively. The total number of oocytes recovered was 11,815 in 468 OPU procedures analyzed, with the average number of oocytes recovered per donor being 25.1 ± 13.4 . The means of the number of oocytes recovered for the animal were 10.86 ± 0.30 , 23.47 ± 0.32 and 44.84 ± 1.03 for the L-OR, I-OR and H-OR groups, respectively. A logistic regression analysis showed an increase in the probability of obtaining embryos according to the increase in the number of recovered oocytes. In the second stage, the genital organs of 26 females were collected for the morphometric evaluation of the ovaries, uterine tube and uterus. The animals were divided into classes of age (<56, from 56 to 90 and >91 months), status (anestrus, cycling, pregnant), antral follicle count (AFC; <15, from 15 to 33 follicles and >34 follicles) e total aspirated oocytes (TAO; <15, from 15 to 33 oocytes e > 34 oocytes). The classes were analyzed considering the following variables: age, right ovary width, right ovary thickness, right ovary length, right ovary volume, right ovary weight, number of follicles counted in the right ovary, left ovary width, thickness of left ovary, length of left ovary, volume of left ovary, number of follicles counted in left ovary, total follicles counted in both ovaries, length and weight of right fallopian tube, length and weight of left fallopian tube, length of uterine horns

right and left, number of aspirations, average total aspirated oocytes, average total viable oocytes, average number of produced embryos, total viable embryos/OPU, total transferred embryos/OPU, total number of embryos obtained/donor, total number of pregnancies obtained after embryo transfer. For the quantitative parameters, the values obtained were tested for data normality using the Lilliefors test and the homoscedasticity of the variances using the Cochran and Bartlett tests. Simple Pearson correlation was performed for quantitative variables. Length of right ovarian was higher for older animals, while length of left ovarian was significantly higher only for older animals than for animals of intermediate age. There was a moderate negative correlation between the number of follicles present in the ovaries and the age of the animals.

Keywords: Oocyte. Cows. Reproduction. Fertility.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Oogênese	10
2.2. Fatores que afetam a reserva folicular ovariana	11
2.3. Foliculogênese – Fase pré-antral.....	12
2.4. Foliculogênese – Fase antral.....	15
2.5. Contagem de folículos antrais	16
2.6. CFA, AMH e eficiência reprodutiva	17
2.7. Efeito da CFA na produção de embriões	20
2.8. Relação CFA e hormônios reprodutivos	21
2.9. CFA e órgãos reprodutivos	22
2.10. Repetibilidade e herdabilidade das características reprodutivas.....	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4. Diferenças na produção <i>in vitro</i> de embriões provenientes de doadoras de oócitos da raça Gir classificadas com baixo, intermediário ou alto número de oócitos recuperados	40
4.1. INTRODUÇÃO	40
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.4. CONCLUSÕES	47
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
5. Relação entre o histórico da produção <i>in vitro</i> de embriões de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro com biometrias uterina e ovarianas <i>post mortem</i>	51
5.1. INTRODUÇÃO	51
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.4. CONCLUSÕES	65
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresentou importante crescimento nos últimos anos, ultrapassando o número de embriões produzidos *in vivo* (Sanchez et al., 2019). O Brasil tem se destacado neste cenário, visto que é responsável por aproximadamente 25 % da PIVE no mundo, sendo o país com maior número de embriões transferidos em 2018 (IETS, 2019).

A utilização da PIVE permite a multiplicação e disseminação de animais geneticamente superiores. Além disso, o uso da PIVE em larga escala no país é impulsionado pelo fato de grande parte do rebanho brasileiro ser constituído de animais *Bos primogenitus indicus* (De Oliveira, 2018), uma vez que vacas zebuínas apresentam maior quantidade de folículos antrais (Baldrighi et al., 2014) e, conseqüentemente, maiores números de oócitos recuperados, oócitos viáveis e embriões produzidos/aspiração quando comparadas com *Bos primogenitus taurus* (Pontes et al., 2010).

A relação entre a contagem de folículos antrais (CFA) e a fertilidade tem sido alvo de estudo (Ireland et al., 2011; Mossa et al., 2012), uma vez que animais com alta CFA, apresentam maiores quantidade (Pontes et al., 2010; Pontes et al., 2011) e qualidade dos oócitos recuperados (Ireland et al., 2009), além de maior taxa de clivagem, maior taxa de blastocisto (Santos et al., 2016) maiores número de embriões produzidos (Silva-Santos et al., 2014) e número de prenhez quando comparados com animais com baixa CFA (Pontes et al., 2011) . Desta forma, tem sido discutido se a CFA poderia ser um critério de seleção para fertilidade dos animais (Morotti et al., 2015).

O Gir é uma raça zebuína, originária das regiões de Gir da Península de Kathiawar. Acredita-se que os primeiros exemplares da raça foram introduzidos no Brasil em 1906 por Teófilo Godoy ou pelo Sr. Wirmondés Machado Borges em 1919. Além disso, outras importações ocorreram em 1930, 1955, 1960 e 1962, contribuindo para a formação do Gir brasileiro. Na década de 30, alguns criadores identificaram animais da raça Gir que se destacaram pela capacidade de produção leiteira e, desde então, iniciaram os trabalhos para seleção de animais Gir com aptidão para produção de leite, com destaque para criação da Associação Brasileira de Criadores do Gir Leiteiro (ABCGIL) em 1980 e Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir Leiteiro (PNMGL) em 1985. Desde então, todos os anos é publicado pela ABCGIL/EMBRAPA o sumário brasileiro de touros, onde se

verifica o resultado do Teste de Progênie. Vem crescendo a utilização do Gir Leiteiro para cruzamento de animais com algum grau de sangue europeu (por exemplo, cruzamento com a raça Holandesa para produção de animais Girolando) a fim de promover heterose, permitindo aumentar a rusticidade, longevidade, vigor e docilidade dos animais sem prejudicar a produção leiteira. A raça Gir também se destaca pela grande produção de sólidos no leite (Porter, 2002; Souza Sobrinho et al., 2003).

Considerando a busca por fêmeas Gir capazes de produzir maior número de embriões e melhores resultados de prenhez, este estudo tem como objetivo melhor compreensão das possíveis correlações do número de oócitos recuperados por aspiração folicular com a PIVE e morfometria dos órgãos genitais femininos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oogênese

Nos primeiros meses de vida fetal da fêmea bovina, é necessário o início da oogênese, na qual células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a crista genital ainda em desenvolvimento e passam por numerosas divisões mitóticas, originando as oogônias (Smits e Cortvrindt, 2002; Van Den Hurk e Zhao, 2005). Estas oogônias, contendo C-Kit, interagem com células mesonéfricas adjacentes que possuem Kit-Ligante para formação dos cordões oovígeros que irão separar as oogônias do interstício (Scaramuzzi et al., 2011), onde algumas continuam a proliferação por divisões mitóticas e algumas diferenciam em ovócitos primários (iniciam divisões meióticas). Subsequentemente ocorre uma perda da maior parte das oogônias e ovócitos primários por apoptose (Hittel et al., 2009) autofagia ou necrose. Assim, considera-se que estas vias de morte celular são essenciais para o adequado funcionamento dos processos de desenvolvimento, garantindo número suficiente de células, além de modular os recursos disponíveis para o desenvolvimento e facilitar a formação da reserva adequada de folículos primordiais (Grive, 2020).

Os ovócitos primários sobreviventes são interrompidos no estágio de diplóteno da prófase I e, quando rodeados por uma única camada de células foliculares achatadas (também denominadas células pré-granulosas) formam os folículos primordiais (Fortune et al., 2003; Scaramuzzi et al., 2011). Estes folículos irão

compor a reserva folicular ovariana (Findlay et al., 2019) e sua formação inicia entre 90 a 140 dias da vida fetal (Yang e Fortune, 2008).

Ao nascimento, a reserva folicular da bezerra é de 100.000 a 250.000, podendo variar dependendo da raça, genética, nível hormonal e ambiente uterino durante a gestação (Nilson e Skinner, 2009; Fortune et al., 2010; Ferreira, 2012; Walsh et al. 2014; Weller et al., 2016) Em ruminantes, todos os folículos primordiais são formados durante a vida fetal e, quando a população de folículos primordiais é estabelecida, grupos de folículos iniciam o crescimento gradualmente e sucessivamente (Van Den Hurk et al., 1997). Os folículos primordiais em bovinos variam de 30 a 50 μm , enquanto os oócitos presentes nestes apresentam em torno de 20 a 35 μm de diâmetro (Hulshof et al., 1994).

2.2. Fatores que afetam a reserva folicular ovariana

A formação dos folículos e estabelecimento da reserva ovariana durante a vida fetal pode sofrer influência de diversos fatores (Evans et al., 2012), por exemplo, a concentração de esteroides no microambiente ovariano durante esta fase pode regular a formação dos folículos, afetando a quantidade de folículos que compõem a reserva ovariana (Nilsson e Skinner, 2009; Fortune et al., 2010). Considerando o efeito do ambiente uterino materno na concentração de AMH, Akbarinejad et al. (2018) observaram que filhas de nulíparas e primíparas da raça Holandesa apresentaram menor concentração plasmática de AMH do que filhas de vacas pluríparas da mesma raça. Além disso, novilhas filhas de vacas com mais de quatro anos tiveram maior peso ao nascimento, ovários maiores e mais pesados, maiores números de folículos primordiais, secundários e folículos antrais quando comparadas com novilhas filhas de primíparas, assim como observado por Cushman et al. (2009), onde bezerras nascidas mais pesadas tiveram ovários mais pesados e com maior número de folículos antrais. De forma similar, Tenley et al. (2019) observaram que a morfometria, o peso ovariano e o número de folículos antrais e pré-antrais em ovários de novilhas foram influenciados pela idade da mãe.

Adicionalmente, a nutrição materna pode influenciar no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de ratas (Bernal et al., 2010) ovelhas (Borwick et al., 1997; Rae et al., 2001) e vacas (Sullivan et al., 2009). Menor número de folículos antrais foi observado em ovários de novilhas filhas de vacas com restrição alimentar (60 % do requerimento de energia de manutenção) durante o terço inicial da gestação, quando comparadas às filhas de vacas sem restrição alimentar (Mossa et al., 2013). Além

disso, Weller et al. (2016) observaram menor população de folículos primordiais e folículos totais em ovários de fetos de vacas com alta ingestão (*ad libitum*) comparada com moderada ingestão de alimento (100 % do requerido para manutenção). No entanto, restrição ou acréscimo de 25 % na dieta da mãe durante o segundo e terceiro trimestre da gestação não influenciaram a reserva ovariana das filhas (Cushman et al., 2014). A relação positiva entre o peso ao nascimento com peso ovariano e CFA foi observado por Cushman et al. (2009), porém, diferentes dietas oferecidas após a desmama não influenciam na reserva folicular de novilhas (Admundson et al., 2015).

Adicionalmente, filhas de vacas com alta contagem de células somáticas (CCS) crônica no leite durante a gestação tinham baixas concentrações plasmáticas de AMH, ovários menores e menor número de oócitos de boa qualidade, evidenciando a importância da saúde materna no desenvolvimento reprodutivo da prole (Ireland et al., 2011). Além disso, Succu et al. (2020) observaram que a temperatura do ambiente durante o desenvolvimento inicial do feto (1º trimestre de gestação) influenciou na CFA e concentração de AMH das novilhas da raça Holandesa, assim, quando esta fase de desenvolvimento ocorreu no verão a CFA e AMH foram menores (9 folículos e 400 pg/mL, respectivamente) quando comparado ao desenvolvimento no inverno (12 folículos e 650pg/mL, respectivamente).

2.3. Foliculogênese – Fase pré-antral

O processo de foliculogênese compreende a formação, ativação, crescimento e maturação folicular, sendo iniciado na vida fetal e resulta na formação de um folículo com capacidade ovulatória (Picton, 2001). A foliculogênese pode ser dividida em fases pré-antral a qual é independente de gonadotrofinas e fase antral, a qual é dependente de gonadotrofinas (Ferreira, 2010).

Considera-se que o folículo pré-antral é ativado quando são observadas alterações morfológicas como crescimento do oócito, diferenciação e proliferação das células da granulosa, onde algumas destas células que rodeiam o oócito passam a ser cuboides, formando o folículo primário (Van Den Hurk et al., 1997) com diâmetro variando de 40 a 60 μm e o oócito com diâmetro de 30 a 40 μm (Hulshof et al., 1994). A ativação de folículos pré-antrais é um processo irreversível, ou seja, uma vez que o folículo primordial é ativado, ele evolui para os estágios subsequentes ou entra em apoptose (Findlay et al., 2019). O mecanismo responsável pela ativação e seleção dos folículos primordiais para o

desenvolvimento não está completamente esclarecido, mas diversos estudos têm demonstrado fatores que podem estar envolvidos neste processo (Fortune et al., 2000; Yang e Fortune 2008; Yang et al., 2017).

Sabe-se que tanto a formação quanto a ativação de folículos pre-antrais não dependem da ação de gonadotrofinas (Richards, 2001) e, possivelmente são reguladas por fatores produzidos localmente que exercem ações parácrinas e autócrinas (Ferreira, 2012). Knigh e Glister (2006) mostraram que alguns membros da superfamília de fatores de crescimento transformante beta (TGF- β) exercem papel fundamental no desenvolvimento folicular desde os estágios pré-antrais. Estudos *in vitro* de cultivo ovariano demonstram efeitos positivos da adição de KIT-Ligante, fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento fibroblasto-básico (FGF-b) e insulina na ativação de folículos primordiais (Fortune, 2003). Fortune et al. (2011) realizaram cultivo *in vitro* de córtex ovariano de feto bovino em meio Waymouth acrescido de ITS+ (insulina, transferrina, ácido selênio, albumina sérica bovina e ácido linoleico) ou TS+ (semelhante ao ITS+, exceto pela ausência de insulina). Estes autores observaram que em meio ITS+, houve aumento do número de folículos primários e diminuição do número de folículos primordiais, evidenciando que a presença de insulina no meio de cultivo *in vitro* atua como potente estimulador da ativação folicular. No entanto, no meio TS+ os folículos mantiveram saudáveis embora não houvesse aumento de primários nem diminuição de primordiais,

Durlinger et al. (1999) sugeriram que o hormônio anti-Mulleriano (AMH) exerce efeito de inibição da ativação folicular, ao observarem que ratas mutantes nulas de AMH, apesar de serem férteis, apresentaram depleção precoce da reserva de folículos ovarianos quando comparadas às *wild-type*. Com intuito de investigar interações entre o AMH e outros fatores relacionados à ativação folicular, Nilsson et al. (2007) relataram que o AMH suprimiu a expressão de fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), proteína morfogênica óssea-15 (BMP-15), proteína morfogênica óssea-4 (BMP-4) e de receptores C-KIT e receptor FGF. Nesse sentido, mais recentemente, Yang et al. (2017) demonstraram efeito do AMH na ativação de folículos primordiais. Estes pesquisadores cultivaram córtex ovariano de fetos bovinos e utilizaram meio com insulina atuando como fator ativador (Fortune et al. 2011) e observaram que, com 12 dias de cultivo o AMH reduziu em 50% no número de folículos primários em comparação com o grupo controle, além de serem observadas diferenças entre os grupos nos diâmetros dos oócitos e dos folículos.

Além disso, estes autores demonstraram por análise imuno-histoquímica que células da granulosa de folículos secundários e pequenos folículos antrais foram coradas para AMH, sugerindo a produção deste hormônio por estas células e inferindo que o AMH produzido nos estágios secundário e posterior poderia inibir a ativação e retardar o crescimento de folículos primários (Fortune et al., 2011; Yang et al., 2017).

A constante atividade proliferativa das células da granulosa resulta na formação de mais de uma camada destas células ao redor do oócito, quando este folículo passa a ser classificado como folículo secundário, podendo apresentar até seis camadas de células da granulosa e medindo aproximadamente 150 μm de diâmetro (Lussier et al., 1987). Esta transição de estágio primário para secundário apresenta importante participação do GDF-9 nas células da granulosa, por exibir efeito proliferativo destas células (Vitt et al., 2000; Gilchrist et al., 2006), uma vez que ratas knockout para GDF-9 mostraram-se estéreis devido ao bloqueio do desenvolvimento folicular no estágio de primário para secundário (Donj et al., 1996).

Durante o crescimento inicial do folículo secundário, fibras de tecido conjuntivo são arranjadas paralelamente à membrana basal para formação das células da teca (Van Den Hurk et al., 1997), onde novamente parece haver efeito do GDF-9, sendo envolvido no recrutamento de células do estroma ovariano (Juengel e McNatty, 2005). Neste momento, já se tem formada a zona pelúcida, uma camada glicoproteica entre o oócito e a camada da granulosa mais interna. Enquanto o suprimento de nutrientes em folículos nos estágios anteriores era por meio de difusão passiva através dos vasos sanguíneos presentes no estroma ovariano, neste momento, a formação de capilares envolvendo as células da teca se mostra necessária para o crescimento folicular nos próximos estágios, embora as células da granulosa permaneçam avasculares (Tamanini e De Ambrogi, 2004; Robinson et al., 2009). Adicionalmente, em torno de 40% da proliferação das células da teca é de origem endotelial (Martelli et al., 2009) e o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) é um possível candidato para promover a angiogênese, uma vez que a administração deste fator é capaz de estimular o desenvolvimento de folículos secundários em vacas (Yang e Fortune, 2007). Ainda no estágio de folículo secundário, o oócito bovino alcança em torno de 60 μm de diâmetro, ocorre formação dos grânulos corticais no oócito e é possível observar o desenvolvimento das junções GAP entre o oócito e as células da granulosa (Gilchrist et al., 2004). A formação destas junções é controlada pelo estrógeno (Schams e Berisha, 2002) e

estas permitem o transporte bidirecional, entre o oócito e as células da granulosa, de metabólitos, nutrientes e moléculas reguladoras (Albertini et al., 2001).

2.4. Foliculogênese – Fase antral

No estágio de folículo secundário ocorre proliferação das células da granulosa, formando até 4-6 camadas e, este estágio termina quando é formada a cavidade antral, quando este folículo passa a ser chamado de folículo terciário ou antral (Fortune, 2003).

Com o desenvolvimento do antro e crescimento folicular, estes folículos que antes desenvolviam por estímulos de fatores intraovarianos com ações parácrina e autócrina, passam a ser dependentes de gonadotrofinas para continuarem o desenvolvimento a partir de 3-4 mm de diâmetro (Fortune, 2003). Assim, a presença de líquido no antro folicular permite a visualização destes folículos com uso da ultrassonografia, contribuindo para compreensão e monitoramento da dinâmica de crescimento folicular.

A emergência de um grupo de folículos com 3-4 mm é precedida por uma onda do hormônio folículo estimulante (FSH; Adams et al., 1992) sendo este responsável pelo crescimento e desenvolvimento destes folículos principalmente até a fase de desvio folicular. Neste momento, o hormônio luteinizante (LH) apresenta importante função para iniciar a esteroidogênese por estímulo da expressão de P450_{scc} via AMPc. O FSH atua estimulando a mitose das células da granulosa e aumentando o processo de aromatização pelo estímulo da enzima P450_{aromatase}, resultando na produção de estradiol a partir de androstenediona (Miller e Richard, 2011). Além disso, o momento em que o folículo passa a ser dependente de FSH para o seu crescimento coincide com o período de proliferação e separação das células da granulosa em células do cumulus e células murais (Richards, 2001). O crescimento destes folículos durante o ciclo estral segue cronologicamente o desenvolvimento pré antral. Contudo, nem todos os folículos crescem durante o ciclo estral, pois a maioria é perdida pelo processo de apoptose (Aerts e Bols, 2010a). Assim, 99,9 % dos folículos primordiais da reserva ovariana morrem por apoptose (Morita e Tilly, 1999). O desenvolvimento de folículos antrais durante o ciclo estral ocorre em padrão de ondas (Evans et al., 1994), sendo geralmente 2 ou 3 ondas, mas podendo ocorrer uma ou quatro ondas por ciclo estral (De Rensis e Peters, 1999). O recrutamento compreende o crescimento de um pool de folículos antrais a cada onda folicular, desenvolvendo os folículos que escaparam do processo de apoptose

devido aumento na concentração de FSH (Aerts e Bols, 2010b). Durante cada onda do ciclo estral, os folículos recrutados são submetidos à seleção e normalmente apenas um folículo se torna dominante enquanto o restante entra em atresia (Ginther et al., 2000). Após a emergência de um grupo de folículos, inicia-se fase de crescimento comum, onde observa-se todos folículos com aproximadamente 4mm de diâmetro apresentam a mesma taxa de crescimento (Ginther, 2016). Neste momento, os folículos em crescimento (3-5mm) produzem fatores como a inibina, hormônio relacionado ao declínio na concentração de FSH até o momento da seleção folicular (Gibbons et al., 1999; Ginther, 2016). A fase de crescimento comum termina com o início do desvio de diâmetro, fase em que há maior mudança nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, onde o futuro folículo dominante continua o crescimento na mesma taxa e há diminuição da taxa de crescimento dos folículos subordinados (Ginther, 2016).

Neste momento, o maior folículo (F1) libera maior concentração de estradiol, responsável (junto com a inibina) por suprimir a concentração plasmática de FSH, permitindo concentração adequada deste hormônio suficiente para o crescimento do F1, mas não para o primeiro folículo subordinado (F2). Havendo também transitório aumento no LH, o F1 passa a ser mais dependente do LH do que do FSH (Mihm et al., 2006; Gomez-Leon et al., 2020), uma vez que receptores para LH desenvolvem nas células da granulosa aproximadamente 8 horas antes de iniciar o desvio (Ginther et al., 2001; Ginther, 2016). Além disso, o aumento na concentração de estradiol afeta a frequência dos pulsos de GnRH, resultando em elevada secreção de LH (Aerts et al., 2010b). O pico de LH estimulado pela alta concentração de estradiol é responsável por desencadear uma cascata de eventos como expressão de genes envolvidos na ovulação (Richards et al., 2002), liberação de agentes inflamatórios, fragilização da túnica albugínea e teca externa, liberação de lipoxinas, produção de hialuronidase e luteinização (Aerts e Bols., 2010b; Ferreira, 2012).

2.5. Contagem de folículos antrais

A soma do número de folículos (> 3 mm) visualizados pelo uso da ultrassonografia nos dois ovários é representada como contagem de folículos antrais (CFA) e tem sido considerado como um marcador de fertilidade, sendo relacionado com índices de eficiência reprodutiva (Mossa et al., 2012; Morotti et al., 2017). Apesar de a CFA ter grande variação entre animais (Burns et al., 2005), esta

apresenta alta repetibilidade em um mesmo animal (Silva-Santos et al., 2014), sendo a repetibilidade do pico de 0,84 e do número médio 0,89 para folículos contados em um mesmo indivíduo durante três ondas do ciclo estral (Ireland et al., 2007).

Além de relatada variação de CFA entre indivíduos da mesma raça, há grande variação entre raças (Alvarez et al., 2000). Baldrighi et al. (2014) observaram diferença nas populações de folículos antrais entre grupos raciais, onde fêmeas da raça Gir (*Bos primogenitus indicus*) apresentaram maior número de folículos antrais (média de 60 folículos) quando comparadas com fêmeas da raça Holandesa (*Bos primogenitus taurus*, média de 35,9 folículos). Entretanto, Silva-Santos et al. (2011) não observaram diferenças no total de folículos pré-antrais entre vacas *Bos primogenitus taurus* e vacas *Bos primogenitus indicus*.

Ovários com alta CFA apresentam maior número de folículos morfologicamente saudáveis em todos os estágios de desenvolvimento (primordiais, primários, secundários e antrais) quando comparados com ovários de baixa CFA (Ireland et al., 2008). Similarmente, Vasconcelos (2017) observou que ovários de vacas pluríparas *Bos primogenitus indicus* com alta CFA apresentaram maior número de folículos primordiais e primários e volume ovariano do que ovários de Intermediária-CFA e Baixa-CFA. Assim, tem sido mostrada uma relação entre a reserva ovariana e a CFA. Ademais, tem sido sugerido que o tamanho da reserva folicular ovariana pode determinar a duração da vida reprodutiva e influenciar na fertilidade durante a vida adulta (Evans et al., 2010; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). Desta forma, pesquisadores têm demonstrado interesse em entender a regulação das fases iniciais do desenvolvimento folicular e eventos que originam a reserva ovariana (Fortune et al., 2013).

2.6. CFA, AMH e eficiência reprodutiva

Diversos estudos têm demonstrado haver alta correlação entre a concentração de AMH plasmático com a CFA, inferindo que a dosagem de AMH pode prever a população de folículos antrais em fêmeas das raças Holandesa (Batista et al., 2014; Baldrighi et al., 2014; Guerreiro et al., 2014), Nelore (Batista et al., 2014; Guerreiro et al., 2014; Grigoletto et al., 2020), Gir (Baldrighi et al., 2014), Tabapuã (Maculan et al., 2018) e Girolando (Cardoso et al., 2018). Entretanto, Gobikrushanth et al. (2017) observaram maior repetibilidade para AMH do que para CFA em vacas lactantes ao avaliar em dia aleatório ou dia esperado da emergência de uma onda folicular,

sugerindo que a dosagem da concentração plasmática de AMH pode ser um marcador mais confiável do que a CFA para testar associações com resultados reprodutivos.

Em vista da alta correlação da concentração de AMH com a CFA, a dosagem do AMH plasmático tem sido utilizada como marcador endócrino em busca de possíveis relações com a eficiência reprodutiva (Baldrighi et al., 2014; Cardoso et al., 2018; Grigoletto et al., 2020).

Novilhas da raça Braford com maior CFA chegaram à puberdade mais cedo, onde maior proporção de novilhas com intermediária (12/17) e alta CFA (7/17) foram inseminadas mais cedo do que baixa CFA (2/16) (Santa Cruz et al., 2018). Enquanto Faria (2020) observou tendência para novilhas da raça Senepol com alta e intermediária CFA serem mais precoces que novilhas com baixa CFA. Adicionalmente, Jimenez-Krassel et al. (2015) observaram que a concentração plasmática de AMH foi positivamente associada com a vida produtiva de novilhas de leite no rebanho, uma vez que novilhas com menor concentração de AMH apresentaram maior probabilidade de serem descartadas após o nascimento do primeiro bezerro. Em contraste, Jimenez-Krassel et al. (2017) observaram que animais com alta CFA tiveram 180 dias a menos no rebanho e houve tendência para estes animais apresentarem menor vida produtiva que vacas com intermediária CFA.

O intervalo de parto-concepção foi menor em animais com alta CFA do que baixa CFA, além disso, houve maior taxa de prenhez por IA após a observação de cio ou com uso do protocolo Ovsynch, maior taxa de prenhez em 6 semanas e taxa de prenhez geral em vacas com alta CFA do que com média ou baixa-CFA (Martinez et al., 2016). Ribeiro et al. (2014) observaram que vacas lactantes que engravidaram durante a estação de monta tiveram maior concentração de AMH do que vacas vazias, além disso, houve maior perda de gestação (de 30 a 65 dias) para animais com baixa concentração de AMH do que vacas com intermediária e alta concentrações (16,7; 8,5 e 8,0 %, respectivamente).

Vacas da raça Holandesa (*Bos primogenitus taurus*) classificadas como alta CFA (≥ 25 folículos) apresentaram maiores taxas de prenhez geral e menor intervalo parto-concepção do que fêmeas classificadas como baixa CFA (≤ 15 folículos), quando inseminadas após a observação de estro. Além disso, vacas com alta CFA tinham 3,34 mais chances de estarem gestantes no final da estação de monta em comparação com vacas de baixa CFA (Mossa et al., 2012). Estes resultados

corroboram com os achados por Cushman et al. (2009) onde menor porcentagem de novilhas com baixa CFA estavam gestantes no final da estação de monta, quando comparadas com novilhas de alta CFA (85,5 e 94,3 %, respectivamente). Vacas repetidoras de cio apresentam menor número de folículos antrais observados no córtex ovariano e menor concentração de progesterona 6 dias após o acasalamento (Maurer e Echternkamp, 1985). Ademais, Gobikrushanth et al. (2019) observaram que vacas com alta e intermediária concentrações de AMH tiveram respectivamente 1,42 e 1,51 vezes mais probabilidade de ficarem gestantes em 84 dias de estação de monta, quando inseminadas após a observação do estro, do que vacas com baixa concentração de AMH, resultando em 90,3; 90,8 e 86,8% de taxas de prenhez ao final da estação para alta, média e baixa concentração de AMH, respectivamente. Adicionalmente, Maculan et al. (2018) encontraram correlação negativa da CFA com intervalo de partos.

Outros estudos apresentam resultados contraditórios, Dos Santos et al. (2016) não observaram influência da CFA na taxa de concepção de vacas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Resultados similares foram observados por Moraes et al. (2016) onde não foi verificada diferença na taxa de concepção de fêmeas com alta, intermediária ou baixa CFA, apesar de haver tendência para animais com baixa CFA apresentarem taxas superiores de concepção. Além disso, maior taxa de concepção foi observada em vacas com baixa CFA (61,7 %) do que vacas com intermediária ou alta CFA (52,9 e 49,5 %, respectivamente) quando submetidas a IATF (Morotti et al., 2018). Além disso, Batista et al. (2020) observaram um comportamento quadrático da concentração de AMH em função do resultado de prenhez após a IATF, onde animais com baixa concentrações de AMH apresentaram baixa taxa de prenhez por inseminação, animais com intermediária concentração de AMH apresentaram resultados superiores de prenhez e animais com alta concentração de AMH apresentando resultado inferior de prenhez por inseminação.

Em relação à dinâmica de crescimento folicular, Mossa et al. (2010) não observaram diferenças no diâmetro dos 3 maiores folículos durante os 3 primeiros dias da onda folicular, sendo iguais para vacas com alta e baixa CFA. Além disso, não foi observada diferença no desenvolvimento do folículo ovulatório 12 horas após a luteólise. Entretanto, Batista et al. (2020) não observaram relação entre a concentração de AMH e fertilidade após a IATF, entretanto animais com alta

concentração de AMH tiveram maior CFA, menor taxa de crescimento folicular após a remoção do dispositivo de P4, menor folículo pré-ovulatório e menor taxa de ovulação. Além disso, Morotti et al. (2018) observaram diferenças na dinâmica folicular, onde diâmetro folicular no D4, D8, D9 e D10 foi maior em vacas com baixa CFA do que vacas com alta CFA, além disso, o diâmetro estimado do folículo ovulatório tendeu ser maior em fêmeas com baixa CFA do que alta CFA.

2.7. Efeito da CFA na produção de embriões

A CFA pode ser usada como ferramenta auxiliar para seleção de animais com maior potencial quantitativo de produção de embriões (Zangirolamo et al., 2018). Paralelamente, a dosagem da concentração de AMH plasmático pode também ser utilizada como marcador endócrino para PIVE, uma vez que, há correlação positiva da concentração de AMH com o número de folículos aspirados, CCOs recuperados, CCOs viáveis e embriões produzidos *in vitro* em fêmeas das raças Holandesa (*Bos primogenitus taurus*) e Nelore (*Bos primogenitus indicus*), embora não tenha sido observada correlação com taxa de blastocisto (Guerreiro et al., 2014).

Assim, Vasconcelos (2017) relatou que o número de oócitos viáveis de grau I e II para fêmeas com alta CFA e o total de embriões foram maiores para fêmeas com alta e intermediária CFA do que em fêmeas de baixa CFA. Além disso, o número médio de blastômeros foi maior em blastocistos (D7) provenientes de animais com alta CFA do que em fêmeas de intermediária e baixa CFA. Contudo, a eficiência da conversão de oócitos viáveis em prenhez foi maior para fêmeas de baixa CFA. Adicionalmente, o número de oócitos recuperados, oócitos submetidos a maturação *in vitro* (MIV), número de blastocistos (dias 6-8), e número de blastocisto eclodido foi 3-4 vezes maior para animais de alta CFA em comparação com baixa CFA, apesar das proporções de oócitos classificados por grau de qualidade. Porém, a taxa de clivagem e rendimento de blastocistos não diferiram quando expresso em porcentagem de CCOs cultivados (Ireland et al., 2007). Similarmente, Rosa et al. (2018) não observaram diferença nas taxas de clivagem e taxas de blastocisto, respectivamente, entre animais com alta CFA (76,6 e 40,6 %) e baixa CFA (79,5 e 38,6 %).

Adicionalmente, Garcia (2017) relatou maior número de oócitos aspirados e oócitos viáveis observados em fêmeas da raça Nelore com alta CFA, contudo, não foi verificada diferença na porcentagem de embriões clivados (80,4 vs. 75,6 %),

enquanto o número e a porcentagem de blastocistos no D7 (39,8 vs. 26,1 %) foram maiores para vacas de alta CFA (entre 23-40 folículos) do que baixa CFA (entre 6-12 folículos). Já em vacas da raça Girolando foram observados maiores números de oócitos recuperados, embriões produzidos e taxas de blastocisto (23,0 vs. 18,4 %) e prenhez (42,7 e 32,7 %) para vacas de alta CFA (entre 35-52 folículos) do que baixa CFA (entre 11-17 folículos). Similarmente, Santos et al. (2016) observaram que vacas com alta CFA tiveram maior proporção de oócitos viáveis, maiores taxa de blastocisto e número de blastocistos viáveis quando comparada com vacas com CFA intermediária e baixa.

Na produção *in vivo* de embriões após a superovulação, Ireland et al. (2007) observaram maiores números de corpo lúteo (CL), embriões transferíveis por animal e proporção de embriões não transferíveis para animais do grupo alta CFA do que baixa CFA, embora a taxa de recuperação de embriões (embriões recuperados/CL) tenha sido semelhante entre os dois grupos. Entretanto, a proporção de embriões transferíveis foi maior para animais de baixa CFA (79,8 %) em comparação com alta CFA (50,7 %). Uma relação direta entre a concentração plasmática de AMH e a resposta superovulatória para produção de embriões também foi verificado por outros autores (Monniaux et al., 2010; Rico et al., 2012; Souza et al., 2015). Isto sugere que a dosagem deste hormônio pode ser um marcador endócrino para prever a capacidade de produção *in vivo* de embriões.

2.8. Relação CFA e hormônios reprodutivos

Além das diferentes concentrações plasmáticas de AMH observadas entre animais de alta e baixa CFA, estudos têm demonstrado possíveis relações com outros hormônios reprodutivos. Por exemplo, a concentração de FSH foi maior antes do pico pós-ovulatório de FSH e as concentrações basais tenderam a ser maior até três dias após o pico da concentração de FSH em vacas com baixa CFA quando comparadas com alta CFA (Ireland et al., 2007). Maior concentração plasmática de FSH em animais de baixa CFA do que alta CFA também foi observada por Sakaguchi et al. (2019). Apesar de Ireland et al. (2007) não verificarem diferenças nas concentrações de estradiol entre animais com alta e baixa CFA, Sakaguchi et al. (2019) observaram maiores concentrações plasmáticas e no fluido folicular de estradiol e testosterona em estágio pré-ovulatório de fêmeas com alta CFA. Apesar de não haver diferença na produção basal de androstenediona, a produção de

androstenediona induzida por LH foi 2,5 vezes maior e a expressão de mRNA para CYP17A1 foi 60% maior nas células da teca (CT) de folículos de vacas com alta CFA do que baixa CFA. Novilhas com baixa CFA tiveram menor concentração sérica de testosterona entre os dias 0 e 14 do ciclo estral do que novilhas com alta CFA, e vacas com baixa CFA tiveram menor concentração entre os dias 6 e 21 do que vacas com alta CFA. Além disso, as concentrações de androstenediona e estradiol no fluido folicular foram 77 % (32,67 vs 109,55 ng/mL) e 26 % (435 vs 588 ng/mL) menores em folículos ovulatórios de animais com baixa do que alta CFA (Mossa et al., 2010). A concentração plasmática de progesterona (P4) foi 30 a 50 % menor entre os dias 3 a 14 do ciclo estral em fêmeas de baixa CFA comparadas com fêmeas de alta CFA, apesar do tamanho do corpo lúteo ter sido similar (Jimenez-Krassel et al., 2009; Martinez et al., 2016). Isto pode ser explicado pela maior capacidade das células luteais de animais com alta CFA produzirem progesterona e 25-hydroxicolesterol em resposta aos pulsos de LH, quando comparadas com animais de baixa CFA (Jimenez-Krassel et al. 2009). Em contraste, Sakaguchi et al. (2019) não verificaram diferenças da concentração de P4 entre animais de alta e baixa CFA, enquanto Mossa et al. (2010) não observaram diferenças nas concentrações de progesterona no fluido folicular de animais com baixa e alta CFA (123 vs. 101 ng//mL).

2.9. CFA e órgãos reprodutivos

Mudanças morfológicas nos órgãos reprodutivos ocorrem constantemente e estão relacionadas com eventos biológicos como puberdade, ciclo estral, gestação e período pós-parto (Nascimento et al., 2003; Hafez e Hafez, 2004; León, 2014). Ovários com alta CFA apresentam maiores peso e volume, além de maior número de folículos pré antrais compondo a reserva ovariana, quando comparados com ovários com baixa CFA (Ireland et al., 2008; Vasconcelos, 2017) assim como maior diâmetro, perímetro e área ovariana em vacas com alta CFA do que baixa CFA (Morotti et al., 2018). Em contraste, num estudo morfológico comparativo de ovários de vacas e novilhas, Monteiro et al. (2009) observaram maior porcentagem de folículos antrais em ovários novilhas do que vacas da raça Nelore. Entretanto, os ovários de vacas foram mais pesados. Assim, Maculan et al. (2018) não observaram influência do volume ovariano na CFA.

O epitélio de revestimento da tuba uterina é constituído principalmente por células ciliadas e células não ciliadas secretoras, sendo que a proporção e o volume destas células podem variar de acordo com as alterações hormonais durante o ciclo estral (Yániz et al., 2000; Morkhtar, 2015). As células secretoras estão envolvidas na secreção do fluido do oviduto e este apresenta papel importante nas funções espermáticas e desenvolvimento do embrião (Hafez e Hafez, 2004). Fontes et al. (2018) observaram diferença no comprimento tubárico entre fêmeas das raças Nelore e Aberdeen Angus, mas não houve diferença para esta característica entre animais com alta ou baixa CFA. Entretanto, foram observadas diferentes concentrações de proteínas na ampola tubárica em animais com alta (5.70 µg/µL) e baixa (8.99 µg/µL) CFA.

Mudanças no útero em resposta aos esteroides ovarianos são observadas durante o ciclo estral e estas alterações são fundamentais para ocorrência tanto da atividade cíclica como para desenvolvimento da gestação. Sob influência do estradiol durante a fase folicular há o aumento da espessura endometrial, com edema e hiperemia endometrial, além de maior atividade de células secretoras de muco (Priedkalns e Leises, 1998). Em contrapartida, durante a fase luteal, o aumento das concentrações de progesterona permite aumento da atividade secretora das glândulas endometriais (Hopper, 2015). Em adição, Jimenez-Krassel et al. (2009) observaram que espessura endometrial, desde a ovulação até 6 dias depois, foi maior em fêmeas com alta CFA do que baixa CFA. Além disso, foi observado que novilhas com alta CFA apresentavam maior peso uterino, maior diâmetro de corno uterino e maior concentração proteica no útero do que novilhas com baixa CFA. Entretanto, McNeel et al. (2017) não verificaram diferença na porcentagem de área endometrial ocupada por glândulas endometriais entre animais com alta e baixa CFA.

2.10. Repetibilidade e herdabilidade das características reprodutivas

Apesar das herdabilidades estimadas para características reprodutivas anteriormente estudadas serem baixas (Berry et al., 2014), a herdabilidade para CFA tem sido alvo de estudo (Walsh et al., 2014), uma vez que esta característica mostrou estar associada com desempenho reprodutivo (Pontes et al., 2011; Mossa et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014; Morotti et al., 2015). Desta forma, Snelling et al. (2012) sugeriram haver herdabilidade baseada no pedigree de 0,73 para CFA em

novilhas de corte. Além disso, Walsh et al. (2014) observaram herdabilidades de 0,25 e 0,31 para CFA em novilhas e vacas da raça Holandesa, respectivamente.

Adicionalmente, Nawaz et al. (2018) analisaram a concentração plasmática de AMH e observaram herdabilidade de 0,43 baseada no pedigree e herdabilidade genômica de 0,36 em novilhas da raça Holandesa. Corroborando, Gobikrushanth et al. (2018) relataram herdabilidade de 0,46 em vacas da raça Holandesa. Em outro estudo, Gobikrushanth et al. (2019) trabalharam com 2.628 vacas de 35 rebanhos e observaram herdabilidade de 0,40 baseada no pedigree e herdabilidade genômica para AMH de 0,45. Além disso, Vizona et al. (2020) verificaram herdabilidade para número de oócitos viáveis, número de oócitos grau I e número de embriões produzidos de 0,32, 0,16 e 0,27, respectivamente, enquanto as repetibilidades para estas características foram 0,63, 0,33 e 0,56, respectivamente. Estes resultados sugerem que a seleção genética para a concentração AMH plasmático poderia melhorar o potencial reprodutivo de rebanhos bovinos, uma vez que há correlações da concentração de AMH e CFA com as características reprodutivas economicamente relevantes (Morotti et al., 2015; Zangirolamo et al., 2018).

Diante do exposto, o conhecimento dos processos fisiológicos e estudos de correlações com diversos parâmetros de biometria ovariana e de órgãos genitais poderão auxiliar no processo de seleção de animais de maior fertilidade e produção, e consequentemente no melhoramento da raça.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUNDSON, O. L.; FOUNTAIN, T. H.; LARIMORE, E. L.; RICHARDSON, B. N.; MCNEEL, A. K.; WRIGHT, E. C.; FREETLY, H. C. Postweaning nutritional programming of ovarian development in beef heifers. **Journal of Animal Science**. v. 93, n. 11, p. 5232-5239, 2015.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, n. 1, p. 171-179, 2010a.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, n. 1, p. 180-187, 2010b.

ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**. v. 78, n. 5, p. 1291-1302, 2000.

BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O. S.; LOPES, R. N. V. R.; VISINTIN, J. A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A. Anti-mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to holstein and Gyr kept under the same management. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p. 1015–1020, 2014.

BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; GIMENES, L. U. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**. v. 13, n. 3, p. 264-272, 2016.

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

BATISTA, E. O.; VIEIRA, L. M.; FREITAS, B. G.; GUERREIRO, B. M.; CARVALHO, J. G. S.; MINGOTI, R. D.; SAMPAIO BARUSELLI, P. Anti-Mullerian hormone and its

relationship to ovulation response and fertility in timed AI Bos indicus heifers. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 55 n. 6, p. 753-758, 2020.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**. v. 132, p. 365–377, 2006.

BERNAL, A. B.; VICKERS, M. H.; HAMPTON, M. B.; POYNTON, R. A.; SLOBODA, D. M. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**. v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.

BERRY, D. P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **Animal**. v. 8 n. 1 p. 105-121, 2014.

BORWICK, S. C.; RHIND, S. M.; MCMILLEN, S. R.; RACEY, P. A.; Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 9, n. 7, p. 711-715, 1997.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

CARDOSO, C. J. T.; DE OLIVEIRA, J. S.; JUNIOR, H. K.; DA SILVA, W. A. L.; DA SILVA ARRUDA; E. D., SOUZA-CÁCERES; M. B. DE A. MELO-STERZA, F. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers. **Animal Reproduction**. v. 15, n. 1, p. 12, 2018.

CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**. v. 87, n. 6, p. 1971-1980, 2009.

CUSHMAN, R. A.; MCNEEL, A. K.; FREETLY, H. C. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. **Livestock Science**, v. 162, p. 252-258, 2014.

DE RENSIS, F.; PETERS, A. R. The control of follicular dynamics by PGF₂ α , GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 34, n. 2, p. 49-59, 1999.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**. v. 383, n. 6600, p. 531-535, 1996.

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

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

EVANS, A. C.; MOSSA, F.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; IRELAND, J. J. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**. p. 421-429, 2010

EVANS, A. C. O.; MOSSA, F.; WALSH, S. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47, p. 31-37, 2012.

FARIA, A. C. F. Influência do número de folículos antrais na eficiência reprodutiva de fêmeas da raça senepol. **Dissertação**. 2020, 45p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais comuns** (causas e tratamentos). Juiz de Fora, MG. 2010. 422p.

FINDLAY, J. K.; DUNNING, K. R.; GILCHRIST, R. B.; HUTT, K. J.; RUSSELL, D. L.; WALTERS, K. A. Follicle selection in mammalian ovaries. **The Ovary**. p. 3-21. 2019.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 163 n. 1-2 p. 53-60, 2000.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction science**. v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; MURUVI, W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. **Society of Reproduction and Fertility, Supplement**. v. 67, p. 203, 2010.

FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; MURUVI, W. 2010. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 23, n. 1, p. 15-22, 2011.

FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; ALLEN, J. J.; HERRICK, S. L. Triennial Reproduction Symposium: the ovarian follicular reserve in cattle: what regulates its formation and size? **Journal of Animal Science**. v. 91, n. 7, p. 3041-3050, 2013.

GARCIA, S. M. Efeito da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões de vacas das raças Nelore e Girolando. **Tese**. 90p, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2017

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine

signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**. v. 119, n. 18, p. 3811-3821, 2006.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**. v. 60, n. 1, p. 72-77, 1999.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**. v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**. v. 63, n. 2, p. 383-389, 2000.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**. v. 65, n. 3, p. 638-647, 2001.

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

GOBIKRUSHANTH, M.; PURFIELD, D. C.; COLAZO, M. G.; BUTLER, S. T.; WANG, Z.; AMBROSE, D. J. The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 101 n. 8 p. 7563-7574, 2018.

GOBIKRUSHANTH, M.; PURFIELD, D. C.; CANADAS, E. R.; HERLIHY, M. M.; KENNEALLY, J.; MURRAY, M.; Butler, S. T. Anti-Müllerian hormone in grazing dairy

cows: Identification of factors affecting plasma concentration, relationship with phenotypic fertility, and genome-wide associations. **Journal of Dairy Science**. v. 102 n. 12 p. 11622-11635, 2019.

GOMEZ-LEÓN, V. E.; GINTHER, O. J.; GUIMARÃES, J. D.; WILTBANK, M. C. Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics II: Progesterone decreases diameter at follicle selection regardless of whether circulating FSH or LH are decreased or elevated. **Theriogenology**. v.143, p.148-156, 2020.

GRIGOLETTO, L.; SANTANA, M. H. A.; BRESSAN, F. F.; ELER, J. P.; NOGUEIRA, M. F. G.; KADARMIDEEN, H. N.; BRITO, L. F. Genetic parameters and genome-wide association studies for anti-müllerian hormone levels and antral follicle populations measured after estrus synchronization in Nelore cattle. **Animals**. v. 10, n. 7, p. 1185, 2020.

GRIVE, K. J. Pathways coordinating oocyte attrition and abundance during mammalian ovarian reserve establishment. **Molecular Reproduction and Development**. v. 87, n. 8, p. 843-856, 2020.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; NETTO, A. C. ACCORSI, M. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 4 p. 96-104, 2014.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**. v. 16 n. 2 p. 78-80, 1994.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M.; BETTERIDGE, K. **Essentials of Domestic Animal Embryology**. 2009. 470p.

IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. Follicle numbers are highly repeatable within

individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**. v. 22 n. 6 p. 1687–1695, 2007.

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

IRELAND, J. J.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**. v. 80, n. 5, p. 954–964, 2009.

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

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS J. S.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**. v.80 n.6, p.1272-1281, 2009.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science**. v.98 n.5, p.3036-3045, 2015.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; PURSLEY, J. R.; IRELAND, J. J. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**. v.100 n.6, p.5019-5027, 2017

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**. v. 11, n. 2, p. 144-161, 2005.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**. v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Reproduction**. v. 81, n. 2, p. 301-307, 1987.

MACULAN, R.; PINTO, T. L. C.; MOREIRA, G. M.; DE VASCONCELOS, G. L.; SANCHES, J. A.; ROSA, R. G.; DE SOUZA, J. C. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal Reproduction Science**. v. 189, p. 84-92, 2018.

MARTELLI, A.; PALMERINI, M. G.; RUSSO, V.; RINALDI, C.; BERNABÒ, N.; DI GIACINTO, O.; BARBONI, B. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.7, n.1, p.1-14, 2009.

MARTINEZ, M. F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; JUENGEL, J. L. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology** v. 85 n. 3, p. 466-475, 2016.

MAURER, R. R.; ECHTERNKAMP, S. E. Repeat-breeder females in beef cattle: Influences and causes. **Journal of Animal Science**. v. 61, n. 3, p. 624-636, 1985.

MCNEEL, A. K.; SOARES, É. M.; PATTERSON, A. L.; VALLET, J. L.; WRIGHT, E. C.; LARIMORE, E. L.; CUSHMAN, R. A. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. **Animal reproduction Science**. v. 179 p. 1-9, 2017.

MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**. v. 74 n. 6, p. 1051-1059, 2006.

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

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**. v. 213, p. 1–17, 1999.

MORAES, F. L. Z.; DINIZ, L. T.; SILVA, C. B.; MOROTTI, F.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M.; LUNARDELLI, P. A. Influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas submetidas à IATF. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. v. 3, p. 311-313, 2016.

MOROTTI, F.; BARREIROS, T. R. R.; MACHADO, F. Z.; GONZÁLEZ, S. M.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction**. v. 12, n. 3, p. 479–486, 2015.

MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; DA SILVA, N. C.; DA SILVA, C. B.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction**. v. 14, n. 3, p. 514-520, 2017a.

MOROTTI, F.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; SILVA-SANTOS, K. C.; ROSO, V. M.; SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. **Theriogenology**. 2017b.

MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 95, n. 5, p. 2355-2361, 2012.

MOSSA, F.; CARTER, F.; WALSH, S. W.; KENNY, D. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. L.; EVANS, A. C. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biology of Reproduction**. v. 88, n. 4, p. 92, 1-9, 2013.

NAWAZ, M. Y.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; STEIBEL, J. P.; LU, Y.; BAKTULA, A.; VUKASINOVIC, N.; TEMPELMAN, R. J. Genomic heritability and genome-wide association analysis of anti-Müllerian hormone in Holstein dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. v. 101 n. 9 p. 8063-8075, 2018.

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

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 313, n. 1-2, p. 9-16, 2009.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**. v. 55, n. 6, p. 1193-1210, 2001.

PONTES, J. H. F.; SILVA K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**. v. 74, n. 8, p. 1349-1355. 2010.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011.

PORTER, Valerie. **Mason's world dictionary of livestock breeds, types and varieties**. CABI, 2002.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female Reproductive System. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-286.

RAE, M. T.; PALASSIO, S.; KYLE, C. E.; BROOKS, A. N.; LEA, R. G.; MILLER, D. W.; RHIND, S. M. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. **Reproduction**. v. 122 n. 6, p. 915-922, 2001.

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

RICHARDS, JOANNE S. Perspective: the ovarian follicle-a perspective in 2001. **Endocrinology**. v. 142, n. 6, p. 2184-2193, 2001.

RICO, C.; DROUILHET, L.; SALVETTI, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; JARRIER, P.; TOUZÉ, J. L.; MONNIAUX, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 24 n. 7, p. 932-944, 2012.

ROBINSON, R. S.; WOAD, K. J.; HAMMOND, A. J.; LAIRD, M.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**. v. 138, n. 6, p. 869-881, 2009.

ROSA, C. O.; MARINHO, L. S. R.; DA ROSA, P. R. A.; DE CESARO, M. P.; LUNARDELLI, P. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; BASSO, A. C.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 53, n. 4, p. 921-929, 2018.

SAKAGUCHI, K.; YANAGAWA, Y.; YOSHIOKA, K.; SUDA, T.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 17 n. 1, p. 1-13, 2019.

SANTA CRUZ, R.; CUSHMAN, R. A.; VIÑALES, C. Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. **Theriogenology**. v. 119, p. 35-42, 2018.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES B. V.; DE MORAES, F. L. Z.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**. v.165, p.17-21, 2016.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**. v.23 n.3, p. 444-467 .2011.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 23, n. 1-2, p. 53-65, 2002.

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

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C. M.; SENEDA, M. M. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, n. 2, p. 228-232, 2014.

SOUZA SOBRINHO, F. D.; ALVIM, M. J.; BOTREL, M. D. A.; MACHADO, D. A. Relatório técnico da Embrapa Gado de Leite 2001-2003. **Embrapa Gado de Leite- Documentos** (INFOTECA-E), 2003.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.98 n.1, p.169-178, 2015.

SMITZ, J. E.; CORTVRINDT, RITA G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**. v. 123, n. 2, p. 185-202, 2002.

SNELLING, W. M.; CUSHMAN, R. A.; FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W.; THOMAS, M. G. How single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. **Journal of Animal Science**. v.90 n.4 p.1152-1165, 2012.

SUCCU, S.; SALE, S.; GHIRELLO, G.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O.; ATZORI, A. S.; MOSSA, F. Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. **Journal of Dairy Science**. v.103, n.12, p.11957-11969, 2020

SULLIVAN, T. M.; MICKE, G. C.; GREER, R. M.; IRVING-RODGERS, H. F.; RODGERS, R. J.; PERRY, V. A. Dietary manipulation of *Bos indicus*× heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 21, n. 6, p. 773-784, 2009.

TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39, n. 4, p. 206-216, 2004.

TENLEY, S. C.; GOMES, R. S.; ROSASCO, S. L.; NORTHROP, E. J.; RICH, J. J.; MCNEEL, A. K.; CUSHMAN, R. Maternal age influences the number of primordial follicles in the ovaries of yearling Angus heifers. **Animal Reproduction Science**. v.200, p.105-112, 2019.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, JEAN-FRANÇOIS. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**. v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997.

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

VASCONCELOS, G. L. Relação entre qualidade oocitária, produção *in vitro* de embriões e características de fertilidade em vacas Brahman e Simental. 2017, 151 p. **Tese**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**. v. 62, n. 2, p. 370-377, 2000

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 78, n. 6, p. 1153-1161, 2008.

YANG, M. Y.; CUSHMAN, R. A.; FORTUNE, J. E. Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. **Molecular Human Reproduction: Basic science of Reproductive Medicine**. v. 23, n. 5, p. 282-291, 2017.

WALSH, S. W.; MOSSA, F.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. J. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 97 n. 7 p. 4503-4511, 2014.

WELLER, M. M. D. C. A.; FORTES, M. R. S.; MARCONDES, M. I.; ROTTA, P. P.; GIONBELI, T. R. S.; VALADARES FILHO, S. C.; GUIMARÃES, S. E. F. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 99 n. 4, p. 3056-3071, 2016.

ZANGIROLAMO, A. F.; MOROTTI, F.; DA SILVA, N. C.; SANCHES, T. K.; SENEDA, M. M. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction**. v. 15 n. 3, p. 310-315, 2018.

CAPITULO 1

4. Diferenças na produção *in vitro* de embriões provenientes de doadoras de oócitos da raça Gir classificadas com baixo, intermediário ou alto número de oócitos recuperados

4.1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução de bovinos contribuem expressivamente para o melhoramento genético animal. A aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU, *Ovum pick up*) associada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) têm destaque neste cenário, uma vez que estas tecnologias permitem a obtenção de maior número de descendentes de fêmeas com mérito genético superior. Diversos estudos têm mostrado fatores que influenciam na eficiência destas biotecnologias reprodutivas, e, apesar dos avanços alcançados, existe grande variabilidade nos resultados obtidos quando utilizadas diferentes raças e categorias de animais como doadores de oócitos (Pontes et al. 2011; Oliveira et al., 2014; Baruselli et al., 2016; Watanabe et al. 2017). No entanto, a PIVE é responsável por 72,7% de embriões bovinos produzidos no mundo, sendo a maior parte destes embriões provenientes de rebanhos leiteiros (Viana, 2019).

Vem crescendo a utilização do Gir Leiteiro para cruzamento de animais com algum grau de sangue europeu (por exemplo, cruzamento com a raça Holandesa para produção de animais Girolando) a fim de promover heterose, permitindo aumentar a rusticidade, longevidade, vigor e docilidade dos animais sem prejudicar a produção leiteira. Além disso, é possível obter maior produção de embriões quando oócitos são coletados de doadoras Gir (*Bos primogenitus indicus*) quando comparada à obtenção de oócitos de doadoras *Bos primogenitus taurus* (Souza Sobrinho et al., 2003; Pontes et al., 2010).

Recentemente, grupos de pesquisas têm buscado entender a influência da população de folículos antrais na fertilidade de fêmeas submetidas às biotecnologias reprodutivas, porém os resultados observados ainda são controversos (Jimenez-Krassel et al., 2017; Cardoso et al., 2018; Grigoletto et al., 2020). Neste sentido, a aspiração folicular de animais com alta contagem de folículos antrais (CFA) permite maior recuperação de oócitos e, em geral, maior número de embriões obtidos destas doadoras. No entanto, as taxas de conversão de oócitos em embriões são maiores para animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus* – Santos et al., 2016), mas não

para animais da raça Holandesa (*Bos taurus taurus* – Ireland et al., 2007) que apresentam alta contagem de folículos antrais. Assim, são necessários estudos que visam explorar os efeitos da quantidade de oócitos recuperados por meio da OPU na eficiência da produção *in vitro* de embriões, uma vez que isso permitiria a identificação de animais com melhores resultados no uso destas biotecnologias.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões quando os oócitos foram recuperados de doadoras da raça Gir Leiteiro (*Bos primogenitus indicus*) com alto, intermediário ou baixo número de oócitos recuperados. A nossa hipótese foi que a probabilidade de obtenção de embriões clivados e embriões obtidos no D7 (sétimo dia de cultivo *in vitro*) seria similar para animais com alto, intermediário e baixo número de oócitos recuperados.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram compilados 495 registros de aspirações foliculares e produção *in vitro* de embriões de doadoras mantidas em uma única fazenda, sendo 93 novilhas, 64 vacas lactantes e 92 vacas não lactantes, com idade média de 57 meses, da raça Gir Leiteiro para produção de embriões Girolando F1 (*Bos primogenitus taurus* x *Bos primogenitus indicus*). As doadoras eram criadas em regime semi-extensivo, manejadas em piquetes com pastagem predominantemente de *Brachiaria Decumbens*, localizadas nas Fazendas do BASA no município de Leopoldina, com latitude 21° 42' 77" S, e longitude 42° 62' 70" O, com altitude de 250 metros do nível do mar, onde o clima se caracteriza como tropical, com temperatura média de 21°C.

Os procedimentos de OPU foram realizados entre dezembro de 2019 e março de 2020, por quatro técnicos e foram utilizadas doses comerciais de sêmen sexado de 16 touros da raça Holandesa. Após a confecção de uma planilha única e as correções das inconsistências, foram excluídos 22 registros de OPU que apresentavam taxa de clivagem ou taxa de blastocisto maior que 100 %, totalizando 473 registros de OPU e PIVE de 255 doadoras (submetidas de 1 a 4 procedimentos de OPU) para serem submetidos às análises estatísticas. As doadoras foram divididas em três grupos, sendo o grupo baixo (B-MTOA) composto por 25 % das doadoras com média de oócitos aspirados inferior (<15), o grupo intermediário (I-MTOA) composto por 50 % das doadoras com MTOA intermediária (entre 15 e 33) e o grupo alto (A-MTOA) composto por 25 % das doadoras com MTOA superior (>34).

Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o *Statistical Analysis System (SAS OnDemand Edition)*.

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett para verificação de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Os dados foram submetidos à transformação estatística (Barbosa, 1983) para estabilização das variâncias e normalização da distribuição dos erros: para o número total de embriões produzidos, $y' = \ln(y + 1)$; e para o número de embriões clivados, $y' = y^{0,34295}$; em que y' é a variável transformada e y é a variável observada.

Os dados foram então submetidos à análise de variância (*GLM Procedure*) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

O efeito do número de ovócitos coletados na aspiração folicular sobre a probabilidade de clivagem e de obtenção de blastocisto foi avaliado por regressão logística univariada (*Logistic Procedure*) com nível de significância de $\alpha = 0,10$. As probabilidades foram calculadas de acordo com a equação (Hosmer e Lemeshow, 2000):

$$P = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x_1}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_1}}$$

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de oócitos aspirados foi 11.815 em 468 procedimentos de OPU analisados, sendo a média de oócitos por doadora de $25,1 \pm 13,4$ similar ao observado por Watanabe et al. (2017), onde observaram média de 23,8 oócitos para doadoras da raça Gir, mas superior ao obtido por Pontes et al. (2010) que observaram média de 17,1 oócitos/OPU para animais da mesma raça. Assim, indicando que há variação na população de folículos antrais e, conseqüentemente, número de oócitos aspirados por doadoras de diferentes rebanhos.

As médias de idade, número de oócitos aspirados, número de embriões clivados, número de embriões obtidos no sétimo dia (D7) do cultivo *in vitro*, taxa de clivagem e taxa de embrião no D7 para os animais classificados como B-MTOA, I-MTOA e A-MTOA estão sumariados na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 1: Valores observados em animais (n=119) classificados com baixa média de oócitos aspirados (B-MTOA)

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Idade(meses)	70,49	36,73	20,1	167,1
Número de oócitos	10,8	0,30	2,0	15,0
Número de embriões clivados	5,5	0,31	0,0	23,0
Número de embriões obtidos no D7	1,8	0,19	0,0	11,0
Taxa de clivagem	52%	0,22	0%	100%
Taxa de embrião D7	17%	0,17	0%	63%

Tabela 2: Valores observados em animais (n=248) classificados com intermediária média de oócitos aspirados (I-MTOA)

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Idade(meses)	58,95	33,87	18,3	166,0
Número de oócitos	23,47	0,32	15,50	33,00
Número de embriões clivados	12,17	0,36	0,00	30,00
Número de embriões obtidos no D7	4,58	0,24	0,00	19,00
Taxa de clivagem	52%	0,18	0%	94%
Taxa de embrião D7	19%	0,15	0%	70%

Tabela 3: Valores observados em animais (n=106) classificados com alta média de oócitos aspirados (A-MTOA)

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo
Idade(meses)	41,73	24,98	19,43	135,56
Número de oócitos	44,84	10,28	33,50	79,00
Número de embriões clivados	23,55	0,86	7,00	48,00
Número de embriões obtidos no D7	8,04	0,51	0,00	27,00
Taxa de clivagem	54%	0,15	15%	88%
Taxa de embrião D7	20%	0,12	0%	49%

Na análise de regressão logística entre o número de oócitos aspirados e a probabilidade de clivagem dos embriões (Figura 1) houve resposta positiva e significativa indicando maior probabilidade de obter embriões clivados quando houve recuperação de maior número de oócitos. Sakaguchi et al. (2019) observaram maior taxa de maturação nuclear em oócitos recuperados de animais com alta contagem de folículos antrais (CFA), apesar de não observarem diferenças nas taxas de clivagem. Contudo, maior proporção de oócitos contendo 2 pró-núcleos após a fertilização *in vitro* foi observada para o grupo de animais com alta CFA do que baixa CFA, inferindo que oócitos de animais com alta população folicular são mais fertilizáveis (Nagai et al., 2015). Além disso, a interação entre as estruturas (CCOs-complexos cumulus-oócito) quando maturadas, fertilizadas e no cultivo de embriões pós fertilização é relatada e, resultados inferiores são obtidos quando estas estruturas são cultivadas individualmente em comparação com cultivo em grupo (Ward et al., 2000). Assim pode-se sugerir que quando recuperado alto número de oócitos, estes tendem a ser beneficiados nos eventos ocorridos *in vitro* por conta da interação entre estas estruturas.

A análise de regressão logística mostrou-se significativa entre o número de oócitos aspirados e probabilidade de obtenção de embrião no D7 (Figura 2), corroborando com os resultados obtidos por Watanabe et al. (2017) com fêmeas da raça Gir. Estes autores relataram menor probabilidade de se obter embriões com o aumento do número de oócitos recuperados, resultando em menores taxas de blastocisto (28,2 %) para o quartil superior quando comparado aos quartis intermediários (28,5 e 29,5 %) e baixo (30,56 %). Em contraste, Santos et al. (2016) observaram maior taxa de blastocisto (41,97 %) para animais com maior número de oócitos recuperados do que animais com intermediário (32,42 %) e baixo (13,04 %) número de oócitos aspirados, quando utilizadas doadoras da raça Nelore.

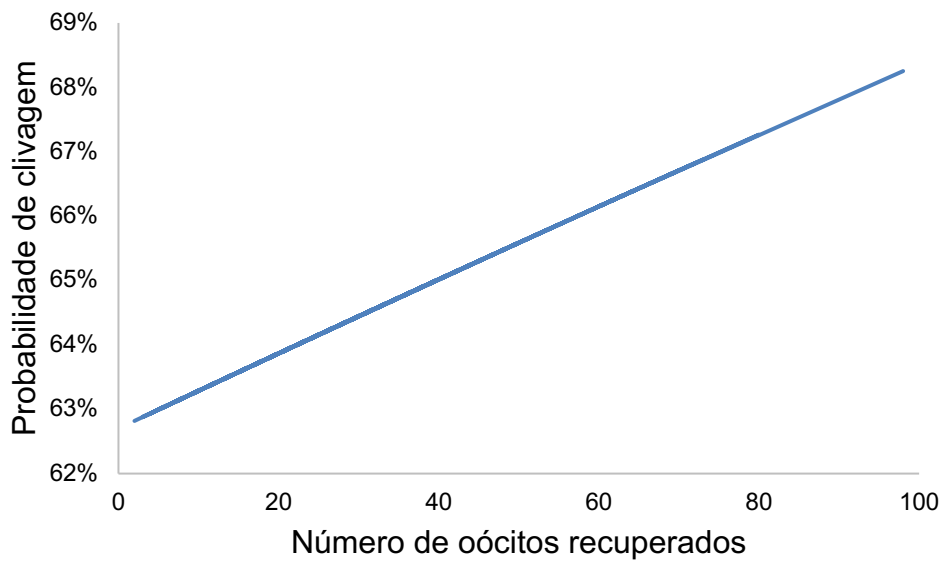


Figura 1: Probabilidade de clivagem de acordo com número de oócitos aspirados de 255 doadoras da raça Gir

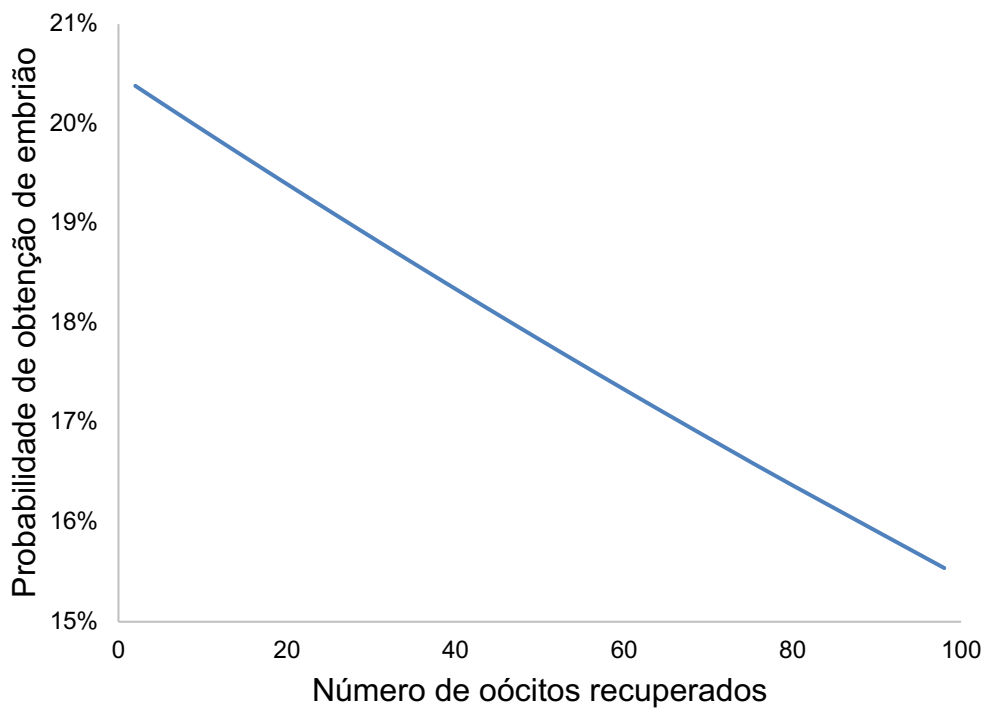


Figura 2: Probabilidade de obtenção de embrião no sétimo dia de cultivo *in vitro* de acordo com o número de oócitos aspirados de 255 doadoras da raça Gir

Como esperado, o número de embriões produzidos de doadoras com alta recuperação de oócitos foi maior do que doadoras dos grupos intermediário e baixo ($P > 0,05$; Figura 3), corroborando com resultados obtidos em diversos trabalhos que

evidenciam relação positiva entre a CFA, número de oócitos aspirados, número de oócitos viáveis e número de embriões produzidos *in vitro*, possibilitando maior número de prenhez e descendentes, contribuindo para o aumento de animais geneticamente superiores e para o maior retorno econômico na propriedade quando utilizada esta biotecnologia (Ireland et al., 2007; Pontes et al., 2011; Guerreiro et al., 2014; Silva-Santos et al., 2014; Santos et al., 2016; Watanabe et al., 2017; Garcia et al., 2020).

Recentemente Garcia et al. (2020) demonstraram que a sincronização da onda folicular anterior à OPU foi capaz de incrementar o número de oócitos viáveis e número de embriões produzidos *in vitro* obtidos de animais com alta CFA, mas não para animais com baixa CFA. Além disso, Nagai et al. (2015) observaram interação da CFA com o intervalo de aspirações, onde a proporção de CCOs de grau I foi menor e a de grau III maior quando animais de alta CFA foram submetidos ao maior intervalo de OPU (7 dias) em comparação com menor intervalo (3 – 4 dias), sugerindo que oócitos provenientes de vacas com maior CFA sejam mais fertilizáveis quando o intervalo de OPU é mais curto.

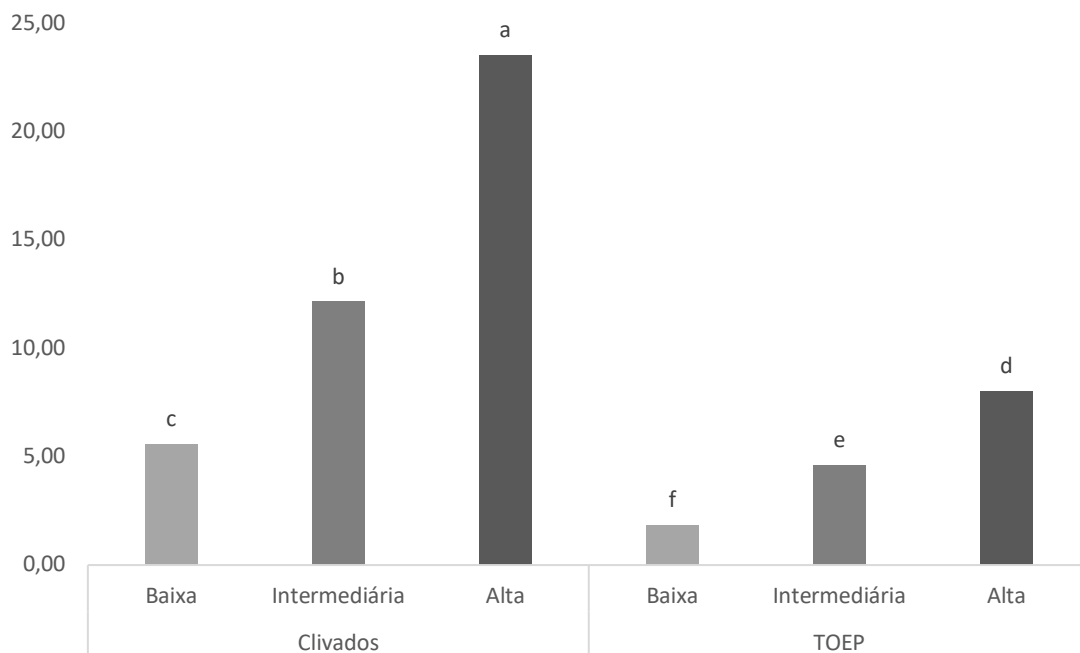


Figura 3: Números de embriões clivados e embriões produzidos (TOEP) no D7 por doadora de acordo com os grupos de número de oócitos aspirados (Baixa, Intermediária e Alta). As letras minúsculas indicam diferença dentro de cada parâmetro avaliado (P < 0,05).

Adicionalmente, a taxa de prenhez após a transferência de embriões provenientes de doadoras da raça Nelore com A-MTOA é menor quando comparada com B-MTOA, mas sem diferenças para embriões de animais da raça Gir (Watanabe et al., 2017). Entretanto, os resultados obtidos com a utilização da inseminação artificial convencional e inseminação artificial em tempo fixo são conflitantes, necessitando mais estudos para melhor compreensão das diferenças entre animais com alta e baixa CFA (Silva Santos et al., 2014; Santos et al., 2016; Jimenez-Krassel et al., 2017; Batista et al., 2020).

4.4. CONCLUSÕES

Fêmeas da raça Gir doadoras de oócitos com alto número de oócitos aspirados apresentam menor taxa de conversão *in vitro* de oócitos em embriões, porém o número médio de embriões obtidos destes animais é maior quando comparado com animais com baixo número de oócitos recuperados.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUSELLI, P.S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; FERREIRA, R.M.; GUERREIRO, B.G.; BAYEUX, B.M.; SALES, J.N.S.; SOUZA, A.H.; GIMENES, L.U. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**. v.13, n.3, p.264-272, 2016.

BATISTA, E. O.; VIEIRA, L. M.; FREITAS, B. G.; GUERREIRO, B. M.; CARVALHO, J. G. S.; MINGOTI, R. D.; BARUSELLI, P. S. Anti-Mullerian hormone and its relationship to ovulation response and fertility in timed AI Bos indicus heifers. **Reproduction in Domestic Animals**. v.55, n.6, p.753-758, 2020.

BARBOSA, J.C.O. Problema de heterocedasticidade na análise de variância. Piracicaba: **ESALQ**, 1983. 14p. Seminário apresentado ao censo de estatística e experimentação de ESALQ-USP.

CARDOSO, C. J. T.; DE OLIVEIRA, J. S.; JUNIOR, H. K.; DA SILVA, W. A. L.; DA SILVA ARRUDA; E. D., SOUZA-CÁCERES; M. B. DE A. MELO-STERZA, F. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers. **Animal Reproduction**. v.15, n.1, p.12, 2018.

GARCIA, S. M.; MOROTTI, F.; CAVALIERI, F. L. B.; LUNARDELLI, P. A.; DE OLIVEIRA SANTOS, A.; MEMBRIVE, C. M. B.; SENEDA, M. M. Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. **Animal Reproduction Science**. v.221, p.106601, 2020.

GRIGOLETTO, L.; SANTANA, M. H. A.; BRESSAN, F. F.; ELER, J. P.; NOGUEIRA, M. F. G.; KADARMIDEEN, H. N.; BRITO, L. F. Genetic Parameters and Genome-Wide Association Studies for Anti-Müllerian Hormone Levels and Antral Follicle Populations Measured After Estrus Synchronization in Nelore Cattle. **Animals**. v.10, n.7, p.1185, 2020.

GUERREIRO, B.M.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; NETTO, A.C. ACCORSI, M. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**. v.4 p. 96-104, 2014.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, 2000. 375p.

IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**. v.22 n.6 p.1687–1695, 2007.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; PURSLEY, J. R.; IRELAND, J. J. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**. v.100 n.6, p.5019-5027, 2017

NAGAI, K.; YANAGAWA, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Fertilizability of oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries. **Animal Reproduction Science**. v.163, p172-178, 2015.

OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. Romano. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio "Biotécnicas da Reprodução em Bovinos" no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. **Embrapa Gado de Leite**. 2014.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES B. V.; DE MORAES, F. L. Z.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**. v.165, p.17-21, 2016.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA,R.L.; LIMA,D.C.M.; SENEDA,M.M. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, n. 2, p. 228-232, 2014.

SAKAGUCHI, K.; YANAGAWA, Y.; YOSHIOKA, K.; SUDA, T.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.17 n.1, p.1-13, 2019.

VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**. v. 38, n. 4, 2020.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B. P.; BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**. v.54 n.3, p.433-446, 2000.

WATANABE, Y. F. DE SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA, E. O. S.; DAYAN, A.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**. v.14 n.3 p.635-644, 2017.

CAPÍTULO 2

5. Relação entre o histórico da produção *in vitro* de embriões de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro com biometrias uterina e ovarianas *post mortem*

5.1. INTRODUÇÃO

Os órgãos reprodutivos das fêmeas bovinas são submetidos a mudanças relacionadas ao desenvolvimento dos órgãos, à dinâmica do ciclo estral e ao desenvolvimento da gestação. Estas mudanças são influenciadas pelos esteroides ovarianos, como o aumento da espessura endometrial e atividade de células secretoras de muco, exercidos pelo estradiol, assim como aumento da atividade de glândulas endometriais exercido pela progesterona (Grunert e Gregory, 1989; Priedkalns e Leises, 1998; Hopper, 2015).

A contagem de folículos antrais (CFA) apresenta alta repetibilidade no mesmo animal, porém apresenta grande variabilidade entre indivíduos (Burns et al., 2005; Silva-Santos et al., 2014). Esta característica está altamente relacionada à reserva folicular ovariana em animais (Ireland et al., 2008), a qual diminui sucessivamente à medida que folículos iniciam o crescimento e entram em apoptose ou culminam com a ovulação (Findlay et al., 2019; Grive et al., 2020). Alguns trabalhos têm demonstrado que animais com maior população folicular antral podem apresentar fertilidade superior em relação aos animais com menor população de folículos antrais (Cushman et al., 2009; Mossa et al., 2012), apesar de outros trabalhos terem demonstrado associação quadrática entre a fertilidade e a concentração de AMH e menor tempo de permanência no rebanho para animais com alta CFA (Jimenez-Krassel et al. 2017; Akbarinejad et al., 2020).

Assim, diversos estudos têm investigado as relações entre a contagem de folículos antrais, características morfométricas dos órgãos reprodutivos e a fertilidade de fêmeas bovinas. Neste sentido, correlação positiva entre a reserva folicular ovariana e o volume ovariano tem sido relatada (Ireland et al., 2008; Akbarinejad et al., 2019). Além disso, estudos mais recentes têm demonstrado maior concentração proteica na tuba uterina de animais com alta CFA e maior espessura endometrial no início do diestro de animais com alta CFA, quando comparados com animais com baixa CFA (Jimenez-Krassel et al., 2009; Fontes et al., 2018).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as relações das características morfológicas *post mortem* de útero, tuba uterina, ovários e histórico da produção *in vitro* de embriões. A nossa hipótese foi que animais com maior volume ovariano apresentariam maior CFA e maior número de embriões produzidos.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Aspecto ético

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA na Universidade Federal de Viçosa, protocolo nº 39/2020 sob a coordenação do professor José Domingos Guimarães do Departamento de Veterinária.

Animais e histórico de criação

Vinte e seis fêmeas, com idade entre 29 e 132 meses, da raça Gir (*Bos primogenitus indicus*) anteriormente criadas em regime semi-extensivo, manejadas em piquetes com pastagem predominantemente de *Brachiaria Decumbens*, criadas nas Fazendas do BASA no município de Leopoldina, com latitude 21° 42' 77" S, e longitude 42° 62' 70" O, com altitude de 250 metros do nível do mar, onde o clima se caracteriza como tropical, com temperatura média de 21°C. A Tabela 4 demonstra a idade, número de procedimentos de aspiração folicular, média de oócitos aspirados, e média de embriões produzidos para cada fêmea.

Coleta

As 26 fêmeas foram destinadas ao abate no Frigorífico Sabor de Minas – Muriaé – MG (SIF: 2556), onde foram coletados os órgãos genitais, sendo estes identificados individualmente e condicionados em caixa isotérmica para serem transportados até o Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em tempo máximo de 2 horas após a coleta.

Mensurações biométricas dos órgãos reprodutivos *post mortem*

Uma vez no laboratório, foram realizadas avaliações macroscópicas (quanto à presença de corpo lúteo e patologias) de cinquenta e dois ovários coletados de 26 fêmeas *Bos primogenitus indicus*, mensurados em três eixos com paquímetro. Para estimativa do volume ovariano, aplicou-se a fórmula:

Volume do ovário = $\frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D1}{2}\right) \times \left(\frac{D2}{2}\right) \times \left(\frac{D3}{2}\right)$, conforme realizado por Penitente-Filho et al. (2015), onde D1, D2 e D3 correspondem a cada eixo mesurado. Em seguida, foi realizada a contagem de todos os folículos antrais (≥ 2 mm) observados em cada ovário. Logo, estes ovários foram pesados individualmente em balança de precisão (0,0001g) e os dados registrados.

As tubas uterinas e os úteros coletados das fêmeas da raça Gir foram dissecados, retirando-se a mesossalpinge e o mesométrio, para seguinte mensuração dos comprimentos destes órgãos com uso de uma fita métrica (Figura 1). O comprimento uterino foi mensurado desde a base do corpo do útero até o ápice de cada corno uterino e foram realizadas as pesagens de cada tuba uterina individualmente. As classes foram analisadas considerando as seguintes variáveis: idade, largura do ovário direito (LARGOD), espessura do ovário direito (ESPOD), comprimento do ovário direito (COMPOD), volume do ovário direito (VOLOD), peso do ovário direito (PESOOD), número de folículos contados no ovário direito (NFOLOD), largura do ovário esquerdo (LARGOE), espessura do ovário esquerdo (ESPOE), comprimento do ovário esquerdo (COMPOE), volume do ovário esquerdo (VOLOE), número de folículos contados no ovário esquerdo (NFOLOE), total de folículos contados nos dois ovários (NFOLT), comprimento (COMPTD) e peso (PESOTD) da tuba uterina direita, comprimento (COMPTE) e peso da tuba uterina esquerda (PESOTE), comprimento dos cornos uterinos direito (COMPUD) e esquerdo (COMPUE), número de aspirações (NOPU), média do total de oócitos aspirados (MTOA), média do total de oócitos viáveis (MTOV), média do número de embriões produzidos (MEP), total de embriões viáveis\OPU (TOTEV), total de embriões transferidos\OPU (TOTETS), número total de embriões obtidos\doadora (TOTED) número de gestações obtidas após transferência dos embriões (GEST) e taxa de gestação (TXGEST).

Delineamento Experimental

Os 26 animais foram agrupados de acordo a idade, status, CFA e número médio de oócitos aspirados (TOA). Para a variável idade foi dividido em três classes (classe 1, animais com menos de 56 meses; classe 2, animais de 56 a 90 meses; classe 3, animais com mais de 91 meses), três classes status (classe 0, animais em anestro, sendo observada presença apenas de folículos nos ovários; classe 1,

animais ciclando não-gestantes observada pela presença de corpo lúteo em um dos ovários; classe 2, animais gestantes), três classes CFA estabelecidas pela soma dos folículos antrais contados nos dois ovários (B-CFA, animais com contagem de folículos antrais <15; I-CFA, animais com contagem de folículos antrais entre 15 e 32; A-CFA, animais com contagem de folículos antrais >32) e 20 animais com histórico de aspiração folicular para produção *in vitro* de embriões divididos em três classes, baseando na média de oócitos recuperados (B-TOA, animais com média de oócitos aspirados <15; I-TOA; animais com média de oócitos aspirados entre 15 e 32; A-TOA animais com média de oócitos aspirados > 33).

Análise Estatística

Para efetuar as análises estatísticas empregou-se o programa estatístico SAEG 9.0 (SAEG/UFV, 2007). Para os parâmetros quantitativos, os valores obtidos foram testados quanto a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors e a homocedasticidade das variâncias pelos testes de Cochran e Bartlett. Posteriormente os valores foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5 % de probabilidade de erro. Os dados que não atenderam as premissas da ANOVA foram avaliados por análise não paramétrica e as médias comparadas pelo teste Kruskal Wallis, com 5% de probabilidade de erro. Efetuou-se a correlação simples de Pearson entre todas as variáveis estudadas.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores médios morfométricos *post mortem* de ovários, tubas uterinas e útero estão sumariados nas tabelas 2, 3, 4 e 5 para as classes de idade, status, CFA e MTOA, respectivamente e os resultados de aspiração e produção *in vitro* de embriões estão sumariados nas tabelas 6 e 7 para as classes de idade e MTOA, respectivamente. Os valores de correlações de Pearson estão sumariados na Tabela 8.

O número médio (\pm desvio padrão) de oócitos recuperados, oócitos viáveis embriões produzidos foram $25,23 \pm 12,31$, $18,79 \pm 9,81$ e $3,76 \pm 3,25$, respectivamente. O número médio de oócitos aspirados no presente estudo foi similar ao verificado por Watanabe et al. (2017) e é condizente com os valores observados em outros estudos utilizando animais *Bos primogenitus indicus* que, em geral, é maior do que o

número de oócitos recuperados em animais *Bos primogenitus taurus* (Pontes et al., 2010; Baldrighi et al., 2014).

Tabela 1: Histórico da produção de embriões de doadoras Gir Leiteiro, em um programa de Produção de Embriões *in vitro* (PIVE) referente a idade em meses, número de aspirações, número médio de oócitos aspirados por procedimento (MTOA) e embriões produzidos por procedimento (MEP)

Fêmea	Idade (Meses)	NOPU	MTOA	MEP
1	109	3	30,67	0,00
2	49	3	34,67	6,00
3	56	1	15,25	0,00
4	109	0	-	-
5	109	4	15,25	1,75
6	74	3	59,67	12,00
7	86	1	25,00	3,00
8	29	1	32,00	5,00
9	86	0	-	-
10	59	1	23,00	3,00
11	61	1	14,00	0,00
12	61	1	22,00	4,00
13	37	1	38,00	0,00
14	43	0	-	-
15	37	0	-	-
16	132	15	32,43	8,43
17	32	0	-	-
18	84	5	6,80	0,60
19	124	19	14,68	3,89
20	92	15	11,00	2,27
21	68	0	-	-
22	124	1	19,00	8,00
23	91	4	20,75	2,00
24	126	12	23,08	6,58
25	126	9	26,11	5,00
26	93	4	41,33	3,67

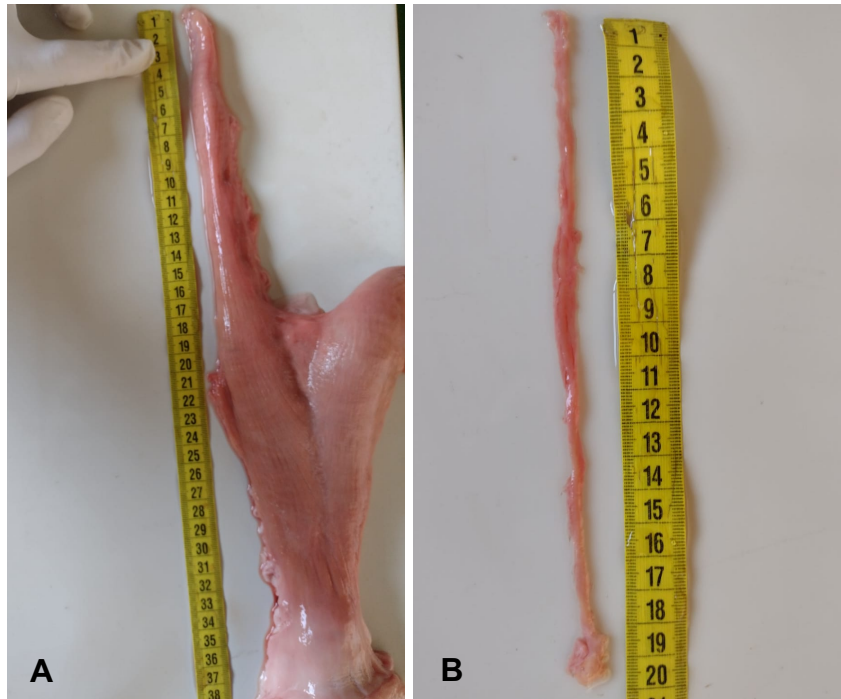


Figura 1: Mensuração do comprimento uterino **(A)**; e da tuba uterina de doadoras Gir Leiteiro após dissecação dos ligamentos **(B)**.

Os volumes médios para os ovários direito e esquerdo foram respectivamente $6,71 \pm 3,12$ e $6,89 \pm 3,46$, sendo estes valores próximos ao observado por Chacur et. (2006) com ovários coletados em abatedouro.

Neste trabalho, o comprimento médio da tuba uterina foi $17,91 \pm 2,72$ cm, sendo menor do que obtidos para animais da raça Nelore (21,4 cm) e Aberdeen Angus (29,06; Fontes et al., 2018).

Animais com idade acima de 91 meses tiveram o comprimento do ovário direito maior do que animais com menos de 56 meses ($P < 0,05$) e não diferiu da classe com idade intermediária, já a espessura do ovário direito foi maior para animais com mais de 91 meses do que entre 56 e 90 ($P < 0,05$). Portanto, não houve diferença significativa entre as classes idade e NFOLT, nem para as demais variáveis estudadas (Tabela 2). Como relatado em outros estudos, há grande variação na CFA entre indivíduos da mesma idade (Burns et al., 2005) que indicam haver características genéticas e do ambiente intrauterino associadas à reserva folicular ovariana e à CFA (Mossa et al., 2013; Walsh et al., 2014; Weller et al., 2016; Tenley et al., 2019), e esta variabilidade poderia justificar a ausência de diferença na CFA entre as classes de idade.

Não foram observadas diferenças entre as classes status para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3).

Como esperado, animais de A-CFA tiveram maior número ($P < 0,05$) de folículos nos ovários direito e esquerdo do que animais da B-CFA (Tabela 4). Em contraste, no presente estudo não se observou diferença significativa nos pesos e volumes ovarianos entre as classes CFA (Tabela 4) e nem no TOA (Tabela 5), diferentemente do que já foi relatado anteriormente na literatura para animais *Bos primogenitus taurus* (Ireland et al., 2008). Contudo, similarmente ao observado no presente estudo, Maculan et al. (2018) também não relataram influência do volume ovariano na CFA.

A largura do ovário esquerdo foi maior para animais da I-TOA do que animais B-TOA ($P < 0,05$), porém não houve diferenças na largura do ovário para animais da A-TOA. Com relação a largura do ovário direito não se observou diferença entre as classes (Tabela 5).

Animais da B-TOA tiveram PESOTD e PESOTE maior do que animais da A-TOA ($P < 0,05$), não sendo verificado diferença significativa para animais da I-TOA (Tabela 5).

Com relação aos procedimentos de aspiração e PIVE, animais com idade superior tiveram maior NOPU do que animais da segunda classe de idade ($P < 0,05$), não sendo encontrada diferença para as demais variáveis analisadas (Tabela 6).

Como esperado, animais da classe A-TOA tiveram maiores MTOA e MTOV ($P < 0,05$) do que as demais classes, porém não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as classes MTOA para as variáveis relacionadas à PIVE e gestação (Tabela 7). Contudo, houve correlação positiva entre o número de oócitos aspirados, número de oócitos viáveis e número de embriões produzidos (Tabela 8), corroborando com os resultados obtidos em outros estudos (Ireland et al., 2007; Pontes et al., 2011; Guerreiro et al., 2014).

Tabela 2: Parâmetros morfométricos *post mortem* de útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas da raça Gir, de acordo com as classes de idade

PARÂMETROS	<56 meses (n=6)	56-90 meses (n=9)	>91meses (n=11)
	Média (Desvio padrão)		
LARGOD (mm)	21,67(5,0)	22,89(4,94)	21,72(3,16)
LARGOE (mm)	21,50(2,81)	20,55(8,98)	23,63(4,80)
ESPOD (mm)	15,83(2,79)	17,56(2,35)	19,00(2,86)
ESPOE (mm)	17,50(3,94)	14,4(6,75)	19,27(3,44)
COMPOD (mm)	26,5(5,31) ^b	30,12(6,07) ^{ab}	34,09(4,67) ^a
COMPOE (mm)	26,83(4,26) ^{ab}	24,0(9,93) ^b	33,45(6,52) ^a
PESOOD (g)	5,81(2,60)	8,21(3,92)	8,53(2,51)
PESOOE (g)	6,15(1,98)	6,21(2,96)	10,03(4,80)
NFOLOD	2,83(13,5)	18,01(7,78)	12,09(4,35)
NFOLOE	17,50(11,04)	13,0(10,46)	12,64(5,95)
NFOLT	38,33(22,77)	31,11(16,75)	24,72(9,61)
VOLOD (cm ³)	5,09(2,35)	6,82(3,85)	7,51(2,74)
VOLOE (cm ³)	5,34(1,61)	5,78(2,97)	8,55(2,97)
COMPTD (cm)	13,05(6,97)	18,32(2,90)	18,67(2,61)
COMPTE (cm)	14,80(7,98)	18,02(2,32)	17,82(2,36)
PESOTD (g)	1,13(0,27)	1,68(0,36)	1,81(0,45)
PESOTE (g)	1,39(0,50)	1,58(0,22)	1,76(0,51)
COMPUD (cm)	22,98(13,19)	25,90(4,69)	29,40(5,58)
COMPUE (cm)	22,55(11,36)	24,60(4,35)	29,97(6,73)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si ($P < 0,05$).

LARGOD: largura do ovário direito; **ESPOD:** espessura do ovário direito; **COMPOD:** comprimento do ovário direito; **VOLOD:** volume do ovário direito; **PESOOD:** peso do ovário direito; **NFOLOD:** número de folículos contados no ovário direito; **LARGOE:** largura do ovário esquerdo; **ESPOE:** espessura do ovário esquerdo; **COMPOE:** comprimento do ovário esquerdo; **VOLOE:** volume do ovário esquerdo, **NFOLOE:** número de folículos contados no ovário esquerdo; **NFOLT:** total de folículos contados nos dois ovários; **COMPTD:** comprimento tuba direita; **PESOTD:** peso da tuba uterina direita; **COMPTE:** comprimento da tuba esquerda; **PESOTE:** peso da tuba uterina esquerda; **COMPUD:** comprimento do corno uterino direito; **COMPUE** comprimento do corno uterino esquerdo;

Tabela 3: Parâmetros morfométricos *post mortem* de útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas da raça Gir, de acordo com as classes de Status (anestro, ciclando ou gestante)

PARÂMETROS	Anestro	Ciclando	Gestante
	(n=4)	(n=16)	(n=5)
	Média (Desvio padrão)		
LARGOD (mm)	22,25(5,79)	21,81(3,88)	23,00(4,89)
LARGOE (mm)	23,00(2,16)	21,62(7,35)	20,80(2,58)
ESPOD (mm)	16,25(3,40)	18,50(2,75)	16,60(2,79)
ESPOE (mm)	19,00(2,44)	15,81(5,75)	19,20(4,32)
COMPOD (mm)	31,00(8,28)	31,93(5,48)	28,40(6,58)
COMPOE (mm)	32,75(2,50)	27,75(9,82)	26,80(6,22)
PESOOD (g)	7,03(4,49)	8,28(3,10)	6,92(2,96)
PESOOE (g)	8,42(1,09)	7,42(4,21)	6,80(3,85)
NFOLOD	12,00(2,94)	16,56(8,36)	19,80(12,91)
NFOLOE	14,00(3,46)	13,75(10,10)	15,40(9,07)
NFOLT	26,00(4,96)	30,31(17,28)	35,20(19,79)
VOLOD (cm ³)	6,67(4,96)	7,00(3,03)	6,02(2,65)
VOLOE (cm ³)	7,54(1,83)	6,62(3,71)	5,93(3,02)
COMPTD (cm)	16,95(4,23)	16,80(5,11)	18,42(3,67)
COMPTE (cm)	17,32(3,37)	16,17(4,99)	19,50(2,54)
PESOTD (g)	1,39(0,61)	1,67(0,39)	1,47(0,55)
PESOTE (g)	1,71(0,70)	1,58(0,44)	1,61(0,33)
COMPUD (cm)	25,67(3,11)	25,24(8,70)	33,54(10,88)
COMPUE (cm)	25,62(2,49)	26,07(9,22)	29,64(4,87)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si (P<0,05).

LARGOD: largura do ovário direito; **ESPOD:** espessura do ovário direito; **COMPOD:** comprimento do ovário direito; **VOLOD:** volume do ovário direito; **PESOOD:** peso do ovário direito; **NFOLOD:** número de folículos contados no ovário direito; **LARGOE:** largura do ovário esquerdo; **ESPOE:** espessura do ovário esquerdo; **COMPOE:** comprimento do ovário esquerdo; **VOLOE:** volume do ovário esquerdo, **NFOLOE:** número de folículos contados no ovário esquerdo; **NFOLT:** total de folículos contados nos dois ovários; **COMPTD:** comprimento tuba direita; **PESOTD:** peso da tuba uterina direita; **COMPTE:** comprimento da tuba esquerda; **PESOTE:** peso da tuba uterina esquerda; **COMPUD:** comprimento do corno uterino direito; **COMPUE** comprimento do corno uterino esquerdo.

Tabela 4: Parâmetros morfométricos *post mortem* de útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas da raça Gir, de acordo com as classes de contagem de folículos antrais (CFA)

PARÂMETROS	B-CFA (n=4)	I-CFA (n=14)	A-CFA (n=8)
	Média (Desvio Padrão)		
LARGOD (mm)	19,0(3,16)	23,07(4,56)	22,00(3,84)
LARGOE (mm)	17,75(2,06)	21,78(7,38)	24,75(3,99)
ESPOD (mm)	15,25(2,21)	18,64(3,1)	17,50(2,0)
ESPOE (mm)	12,75(3,77)	17,78(5,91)	18,37(3,46)
COMPOD (mm)	27,0(8,04)	32,0(6,15)	29,0(3,37)
COMPOE (mm)	23,50(2,38)	30,14(10,51)	28,62(5,06)
PESOOD (g)	5,29(2,43)	8,84(5,79)	7,20(0,58)
PESOOE (g)	3,44(1,36)	9,66(4,23)	6,75(2,46)
NFOLOD	8,0(0,81) ^b	12,7(3,91) ^b	26,37(8,14) ^a
NFOLOE	3,75(2,62) ^c	10,92(4,81) ^b	24,12(5,96) ^a
NFOLT	11,75(2,50) ^c	23,64(4,92) ^b	50,05(11,35) ^a
VOLOD (cm ³)	4,21(1,70)	7,86(3,73)	5,96(1,00)
VOLOE (cm ³)	2,92(1,43)	8,06(3,64)	7,00(2,43)
COMPTD (cm)	20,15(3,52)	16,95(5,58)	16,33(2,15)
COMPTE (cm)	18,85(1,45)	16,20(5,53)	17,85(2,79)
PESOTD (g)	1,61(0,44)	1,69(0,53)	1,47(0,33)
PESOTE (g)	1,53(0,17) ^b	1,74(0,56) ^a	1,44(0,24) ^b
COMPUD (cm)	27,25(2,87)	25,48(10,42)	28,58(8,14)
COMPUE (cm)	28,55(2,98)	25,15(9,39)	27,50(6,38)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si (P<0,05).

LARGOD: largura do ovário direito; **ESPOD:** espessura do ovário direito; **COMPOD:** comprimento do ovário direito; **VOLOD:** volume do ovário direito; **PESOOD:** peso do ovário direito; **NFOLOD:** número de folículos contados no ovário direito; **LARGOE:** largura do ovário esquerdo; **ESPOE:** espessura do ovário esquerdo; **COMPOE:** comprimento do ovário esquerdo; **VOLOE:** volume do ovário esquerdo, **NFOLOE:** número de folículos contados no ovário esquerdo; **NFOLT:** total de folículos contados nos dois ovários; **COMPTD:** comprimento tuba direita; **PESOTD:** peso da tuba uterina direita; **COMPTE:** comprimento da tuba esquerda; **PESOTE:** peso da tuba uterina esquerda; **COMPUD:** comprimento do corno uterino direito; **COMPUE** comprimento do corno uterino esquerdo.

Tabela 5: Parâmetros morfométricos *post mortem* de útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas da raça Gir, de acordo com as classes de oócitos aspirados por procedimento

PARÂMETROS	B-TOA(n=4)	I-TOA (n=11)	A-TOA (n=5)
	Média (Desvio padrão)		
LARGOD (mm)	23,75(5,74)	21,72(3,44)	24,4(4,83)
LARGOE (mm)	14,00(9,66) ^b	23,73(3,40) ^a	23,60(5,77) ^{ab}
ESPOD (mm)	18,50(3,51)	18,27(2,61)	19,00(2,44)
ESPOE (mm)	11,50(8,06) ^b	18,06(3,67) ^{ab}	20,00(4,18) ^a
COMPOD (mm)	30,50(3,41)	33,64(5,70)	31,60(6,50)
COMPOE (mm)	19,25(13,60)	31,09(6,70)	29,60(6,84)
PESOOD (g)	8,83(4,77)	8,70(2,53)	8,53(2,83)
PESOOE (g)	6,65(3,85)	8,25(4,56)	8,88(5,04)
NFOLOD	14,25(6,07)	14,90(7,58)	22,60(11,58)
NFOLOE	7,5(8,18)	14,54(7,42)	18,60(8,56)
NFOLT	21,75(7,45)	29,45(14,49)	41,20(17,51)
VOLOD (cm ³)	7,31(3,74)	7,27(3,06)	7,83(3,40)
VOLOE (cm ³)	4,06(2,24)	7,38(3,59)	7,75(3,87)
COMPTD (cm)	19,62(3,80)	16,65(5,88)	16,38(3,09)
COMPTE (cm)	19,13(1,10)	15,90(5,75)	18,02(3,54)
PESOTD (g)	2,17(0,38) ^a	1,63(0,32) ^{ab}	1,39(0,49) ^b
PESOTE (g)	2,19(0,51) ^a	1,60(0,36) ^{ab}	1,47(0,24) ^b
COMPUD (cm)	26,00(4,69)	26,86(11,77)	30,02(9,24)
COMPUE (cm)	26,5(3,51)	26,52(10,64)	27,10(7,57)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si (P<0,05).

LARGOD: largura do ovário direito; **ESPOD:** espessura do ovário direito; **COMPOD:** comprimento do ovário direito; **VOLOD:** volume do ovário direito; **PESOOD:** peso do ovário direito; **NFOLOD:** número de folículos contados no ovário direito; **LARGOE:** largura do ovário esquerdo; **ESPOE:** espessura do ovário esquerdo; **COMPOE:** comprimento do ovário esquerdo; **VOLOE:** volume do ovário esquerdo, **NFOLOE:** número de folículos contados no ovário esquerdo; **NFOLT:** total de folículos contados nos dois ovários; **COMPTD:** comprimento tuba direita; **PESOTD:** peso da tuba uterina direita; **COMPTE:** comprimento da tuba esquerda; **PESOTE:** peso da tuba uterina esquerda; **COMPUD:** comprimento do corno uterino direito; **COMPUE.**

Tabela 6: Resultados de OPU e PIVE de doadoras da raça Gir de acordo com as diferentes classes de idade

PARÂMETROS	<56 meses	56-90 meses	>91 meses
	(n=3)	(n=7)	(n=10)
	Média (Desvio padrão)		
NOPU	1,66(1,15) ^{ab}	1,62(1,60) ^b	8,60(6,27) ^a
MTOA	34,89(3,00)	23,67(17,07)	23,43(9,34)
MTOV	23,78(5,52)	18,80(13,06)	17,28(8,50)
MEP	3,66(3,21)	3,22(4,19)	4,15(2,81)
TXCONV (%)	13,66(12,34)	13,42(10,61)	27,2(24,93)
TOTEV	3,55(3,10)	3,22(4,19)	3,93(3,06)
TOTETS	3,33(3,05)	1,62(3,33)	2,83(2,08)
TOTED	7,00(8,88)	4,42(9,99)	21,00(21,51)
GEST	3,33(5,77)	2,00(9,43)	7,70(8,02)
TXGEST (%)	19,60(33,96)	20,63(25,80)	29,92(19,42)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si (P<0,05).

NOPU: número de aspirações; **MTOA:** média do total de oócitos aspirados; **MTOV:** média do total de oócitos viáveis; **TXCONV:** taxa de conversão de oócitos em embriões; **MEP:** média do número de embriões produzidos; **TOTEV:** total de embriões viáveis\OPU; **TOTETS:** total de embriões transferidos\OPU; **TOTED:** número total de embriões obtidos\doadora; **GEST:** número de gestações obtidas após transferência dos embriões; **TXGEST:** taxa de gestação.

Tabela 7: Resultados de OPU e PIVE de doadoras da raça Gir de acordo com as diferentes classes de total de oócitos aspirados

PARÂMETROS	B-TOA (n=4)	I-TOA (n=11)	A-TOA (n=5)
	Média (Desvio padrão)		
NOPU	10,00(8,41)	3,45(3,75)	5,20(5,58)
MTOA	11,62(3,59) ^b	22,91(5,44) ^b	41,22(10,85) ^a
MTOV	7,85(2,30) ^b	17,98(5,86) ^b	29,32(10,38) ^a
MEP	1,69(1,75)	3,48(2,54)	6,02(4,56)
TXCONV (%)	15,75(22,15)	22,00(22,32)	20,40(15,32)
TOTEV	1,12(1,87)	3,48(2,54)	5,95(4,56)
TOTETS	0,68(1,10)	2,18(2,23)	4,60(3,29)
TOTED	11,50(21,69)	9,63(15,78)	22,00(20,88)
GEST	2,50(4,36)	3,81(6,50)	9,80(8,25)
TXGEST (%)	17,61(23,64)	22,11(23,20)	37,74(22,24)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre si (P<0,05).

NOPU: número de aspirações; **MTOA:** média do total de oócitos aspirados; **MTOV:** média do total de oócitos viáveis; **TXCONV:** taxa de conversão de oócitos em embriões; **MEP:** média do número de embriões produzidos; **TOTEV:** total de embriões viáveis\OPU; **TOTETS:** total de embriões transferidos\OPU; **TOTED:** número total de embriões obtidos\doadora; **GEST:** número de gestações obtidas após transferência dos embriões; **TXGEST:** taxa de gestação.

Tabela 8: Coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros morfométricos, resultados de aspiração folicular e produção de embriões e classes (Idade, CFA e MTOA)

VARIÁVEIS	n	Idade	CLACFA	CLAMTOA
		r	r	r
LARGOD	26	ns	ns	ns
ESPOD	26	0,44	ns	ns
COMPOD	26	0,51	ns	ns
PESOOD	26	ns	ns	ns
NFOLOD	26	-0,41	0,77	ns
LARGOE	26	ns	0,37	0,47
ESPOE	26	ns	ns	0,51
COMPOE	26	0,38	ns	ns
PESOOE	26	0,42	ns	ns
NFOLOE	26	ns	0,82	0,45
NFOLT	26	-0,34	0,87	0,44
NOPU	21	0,57	ns	ns
VOLOD	26	ns	ns	ns
VOLOE	25	0,41	ns	ns
COMPTD	26	0,45	ns	ns
PESOTD	26	0,55	ns	-0,58
COMPTE	25	ns	ns	ns
PESOTE	25	ns	ns	-0,52
COMPUD	26	ns	ns	ns
COMPUE	26	0,40	ns	ns
MTOA	20	ns	ns	0,84
MTOV	20	ns	0,41	0,75
MEP	20	ns	ns	0,46
TXCONV	20	ns	ns	ns
TOTEV	20	ns	ns	0,50
TOTETS	20	ns	ns	0,52
TOTETD	20	0,38	ns	ns
GEST	20	ns	ns	0,38
TXGEST	20	ns	ns	0,31

ns: não significativo ($P>0,05$)

LARGOD: largura do ovário direito; **ESPOD:** espessura do ovário direito; **COMPOD:** comprimento do ovário direito; **VOLOD:** volume do ovário direito; **PESOOD:** peso do ovário

direito; **NFOLOD**: número de folículos contados no ovário direito; **LARGOE**: largura do ovário esquerdo; **ESPOE**: espessura do ovário esquerdo; **COMPOE**: comprimento do ovário esquerdo; **VOLOE**: volume do ovário esquerdo, **NFOLOE**: número de folículos contados no ovário esquerdo; **NFOLT**: total de folículos contados nos dois ovários; **COMPTD**: comprimento tuba direita; **PESOTD**: peso da tuba uterina direita; **COMPTE**: comprimento da tuba esquerda; **PESOTE**: peso da tuba uterina esquerda; **COMPUD**: comprimento do corno uterino direito; **COMPUE** comprimento do corno uterino esquerdo; **NOPU**: número de aspirações; **MTOA**: média do total de oócitos aspirados; **MTOV**: média do total de oócitos viáveis; **TXCONV**: taxa de conversão de oócitos em embriões; **MEP**: média do número de embriões produzidos; **TOTEV**: total de embriões viáveis\OPU; **TOTETS**: total de embriões transferidos\OPU; **TOTED**: número total de embriões obtidos\doadora; **GEST**: número de gestações obtidas após transferência dos embriões; **TXGEST**: taxa de gestação.

5.4. CONCLUSÕES

Fêmeas da raça Gir com idade avançada apresentam maior comprimento dos ovários, porém há correlação negativa entre a idade da doadora e o número total de folículos antrais presentes nos ovários. Além disso, há correlação entre o número de folículos nos ovários e a média de oócitos aspirados independentemente da idade das doadoras.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARINEJAD, V.; GHARAGOZLOU, F.; VOJGANI, M.; SHOURABI, E.; MAKIABADI, M. J. M. Inferior fertility and higher concentrations of anti-Müllerian hormone in dairy cows with longer anogenital distance. **Domestic animal endocrinology**, 68, 47-53, 2019.

BALDRIGHI, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPCÃO, M.E.O.A. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reproduction in Domestic Animals**. v.49, p. 1015–1020, 2014.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, n.1, p.54-62, 2005.

CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 1971-1980, 2009.

FONTES, P. K.; ERENO, R. L.; PEIXOTO, A. R.; CARVALHO, R. F.; SCARANO, W. R.; TRINCA, L. A.; CASTILHO, A. C. D. S. Can the antral follicular count modulate the gene expression of bovine oviducts in Aberdeen Angus and Nelore heifers? **Plos one**, v. 13 n. 8, e0202017, 2018.

FINDLAY, J. K.; DUNNING, K. R.; GILCHRIST, R. B.; HUTT, K. J.; RUSSELL, D. L.; WALTERS, K. A. Follicle selection in mammalian ovaries. **The Ovary**. p. 3-21. 2019.

GRIVE, KATHRYN J. Pathways coordinating oocyte attrition and abundance during mammalian ovarian reserve establishment. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 8, p. 843-856, 2020.

GUERREIRO, B.M.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; NETTO, A.C. ACCORSI, M. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**. v.4 p. 96-104, 2014.

IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**. v.22 n.6 p.1687–1695, 2007.

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

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS J. S.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**. v.80 n.6, p.1272-1281, 2009.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; PURSLEY, J. R.; IRELAND, J. J. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**. v.100 n.6, p.5019-5027, 2017

MACULAN, R.; PINTO, T. L. C.; MOREIRA, G. M.; DE VASCONCELOS, G. L.; SANCHES, J. A.; ROSA, R. G.; DE SOUZA, J. C. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal Reproduction Science**. v.189, p.84-92, 2018.

MOSSA, F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 95, n. 5, p. 2355-2361, 2012.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, D.C.M.; SENEDA, M.M. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, n. 2, p. 228-232, 2014.

PENITENTE-FILHO, J. M.; JIMENEZ, C. R.; ZOLINI, A. M.; CARRASCAL, E.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, C. O.; TORRES, C. A. A. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**. v. 86, n. 2, p. 148-152, 2015.

PONTES, J. H. F.; SILVA K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74(8), 1349-1355. 2010.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011.

TENLEY, S. C.; GOMES, R. S.; ROSASCO, S. L.; NORTHROP, E. J.; RICH, J. J.; MCNEEL, A. K.; CUSHMAN, R. Maternal age influences the number of primordial follicles in the ovaries of yearling Angus heifers. **Animal Reproduction Science**. v.200, p.105-112, 2019.

WALSH, S.W.; MOSSA, F.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.J. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science**. v.97 n.7 p. 4503-4511, 2014.

WELLER, M. M. D. C. A.; FORTES, M. R. S.; MARCONDES, M. I.; ROTTA, P. P.; GIONBELI, T. R. S.; VALADARES FILHO, S. C.; GUIMARÃES, S. E. F. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. **Journal of Dairy Science**. v.99 n.4, p.3056-3071, 2016.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doadoras da raça Gir com alto número de oócitos aspirados apresentam maior probabilidade de obtenção de embriões clivados e maior número de embriões produzidos, entretanto, a probabilidade de obtenção de embrião no sétimo dia do cultivo *in vitro* diminui a medida de que aumentam o número de oócitos aspirados. Deste modo, a capacidade de produção de embriões de uma doadora se mostra um potencial parâmetro de seleção de doadoras de oócitos. Contudo se faz necessário estudos comparativos entre animais com alto e baixo número de oócitos aspirados e os efeitos de sequências de aspirações foliculares a longo prazo, tanto sobre o número de oócitos aspirados, quanto a longevidade e a eficiência produtiva destas doadoras.