

MARINA AMARO DE LIMA

Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais

São Paulo

2019

MARINA AMARO DE LIMA

Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Perecin

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3837
FMVZ

Lima, Marina Amaro de
Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais / Marina Amaro de Lima. – 2019.
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Percin.

1. Contagem de folículos antrais. 2. Células do cumulus. 3. *Bos indicus*. 4. Oócito. 5. Folículo ovariano. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais", protocolada sob o CEUA nº 8968070518, sob a responsabilidade de **Felipe Perecin e equipe; Marina Amaro de Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/06/2018.

We certify that the proposal "Transcriptional levels of the ovarian follicular environment of *Bos indicus* females with high and low antral follicular count", utilizing 60 Bovines (60 females), protocol number CEUA 8968070518, under the responsibility of **Felipe Perecin and team; Marina Amaro de Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/21/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **10/2018** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **0 a 15 anos**

N: **60**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **0 a 800 kg**

Resumo: Estratégias para correlacionar características fenotípicas à qualidade reprodutiva de bovinos contribuem significativamente para o crescimento da produção de gado de leite e corte mundial. A contagem de folículos antrais (CFA) é uma característica interessante para este propósito, uma vez que possui grande variabilidade entre os animais, alta repetibilidade no mesmo animal, e é de fácil detecção através da utilização de aparelhos de ultrassonografia. Tanto animais *Bos taurus* quanto animais *Bos indicus* com alta ou baixa CFA apresentam índices reprodutivos distintos, tais como capacidade de desenvolvimento embrionário e fertilidade, sendo necessários maiores estudos acerca desta característica, de modo a ser possível a sua maior exploração zootécnica. Diante disto, é proposto no presente projeto o estudo do ambiente folicular ovariano com relação às possíveis diferenças no aspecto transcricional entre os oócitos, células do cumulus, células da granulosa e vesículas extracelulares de fluido folicular de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa AFC.

Local do experimento: FZEA, USP

São Paulo, 21 de junho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LIMA, Marina Amaro

Título: **Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 21/10/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória:

Ao meu porto seguro: minha família

Agradecimentos

A Deus, primeiro e acima de tudo, por me guiar em cada passo, por possibilitar que eu conheça e conviva com pessoas tão maravilhosas na minha trajetória, e por estar comigo em todos os momentos, mesmo quando não sou capaz de perceber;

Aos meus pais Rosana e Francisco e irmãos Paulo e Mauricio, por todo o amor incondicional, apoio, compreensão e por me ajudarem a abraçar cada uma das minhas alegrias e a suportar cada uma das minhas dificuldades;

Ao meu companheiro Filipe por me incentivar e por, juntamente com Valter, Fernanda, Robson, Julia, Daniel, Claudio, Raphael, Letícia, Cecília, Larissa e Douglas, aumentar o meu porto seguro: a minha família;

Às maravilhosas Amanda, Fernanda, Kerstin e ao Lucas, por compartilharem comigo tantos momentos alegres e por disponibilizarem a mim um ombro amigo aconchegante pra sempre que eu preciso;

Aos meus professores, por todo o conhecimento compartilhado e por grande parte das vezes também me ensinarem a ser um ser humano melhor;

Ao professor Felipe Perecin, por ser meu orientador desde as minhas iniciações científicas, por todas as oportunidades e apoio que me proporcionou e por ser um profissional tão inspirador;

A todos os meus orientadores durante a graduação Prof^a. Fabiana Bressan, Prof. Flávio Meirelles, Prof. Lawrence Smith e Prof^a. Maria Cristina Hage (*in memoriam*), por contribuírem para a minha formação científica;

Aos amigos de laboratório Ana Clara, Alessandra, Cibele, Gabriella, Helena, Juliano Sangali, Prof. Juliano da Silveira, Jorge, Lucas, Maite, Rafael, Ramon, Rosane, Tiago entre muitos outros, por serem um grupo tão disposto a ajudar nos experimentos uns dos outros e por compartilharem comigo tantos momentos de crescimento científico, alegrias e desespero (risos);

Aos amigos que fiz durante as disciplinas de mestrado Anaelise, Ana Clara, Catia, Lina, Marisol, Priscila e Rafael, por todo o companheirismo.

Aos demais colaboradores deste projeto, em especial Prof. Pietro, Rômulo, Bernardo, Yeda e Patrícia, por todas as contribuições.

Aos membros das minhas bancas de qualificação e defesa, por contribuírem para que este projeto seja o melhor possível;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por serem a minha casa e por terem me proporcionado tantas amizades, oportunidades e momentos inesquecíveis.

À Daura, aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da FMVZ e das bibliotecas da FZEA e FMVZ por toda a disponibilidade e auxílio;

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro; e

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha graduação e pós-graduação.

O meu muito obrigada de todo o coração e o reconhecimento de que cada um de vocês foi extremamente importante para a realização desta etapa da minha vida!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

DE LIMA, M. A. **Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais**

2019. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A contagem de folículos antrais (CFA) tem sido associada a performance reprodutiva em bovinos. Em fêmeas taurinas, a maior CFA é associada positivamente a taxas de gestação e a melhor produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Contrariamente, a CFA em fêmeas indicinas apresenta correlação negativa com as taxas de gestação após transferência de embriões produzidos *in vitro* ou inseminação artificial em tempo fixo. Os aspectos biológicos que intermediam a relação da CFA com a reprodução ainda são desconhecidos. Sabe-se que o desenvolvimento folicular pode ser regulado tanto por fatores moleculares quanto hormonais. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão gênica nos oócitos e nas células do cumulus (CC), bem como avaliar os níveis séricos de estradiol de fêmeas de baixa CFA (B-CFA) e alta CFA (A-CFA) utilizando novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) como modelo experimental. Novilhas Nelore (n=48) tiveram a onda folicular ovariana sincronizada. No dia 5, a CFA foi realizada e os 10 animais com menor e os 10 com maior CFA foram selecionados para formar respectivamente os grupos de B-CFA (número de folículos <30, AFC = 24 ± 4.73) e A-CFA (número de folículos >60, AFC = 72.3 ± 15.67). Ainda no dia 5, amostras de sangue foram coletadas e os complexos cumulus-oócito foram recuperados por aspiração folicular. As CC e os oócitos foram separados por pipetagens consecutivas. Vinte amostras (pools) de 10 oócitos (1 por animal) e 20 amostras (pools) das CC dos respectivos oócitos (1 por animal) foram usadas para extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação da expressão de 95 genes por PCRq-TR. As médias de expressão gênica normalizadas, usando o *PPIA* como gene de referência, foram comparadas pelo teste T de Student, sendo consideradas significantes quando $P \leq 0,05$. Nos oócitos, 11 genes foram expressos diferencialmente, incluindo 8 com expressão aumentada (*BMP15*, *HAS2*, *EGFR*, *NPR3*, *H1FOO*, *IGFBP2*, *GAPDH* e *HSF1*) e 3 com expressão diminuída (*TFAM*, *PRDX3* e *XBP1*) no grupo de B-CFA, comparado ao grupo de A-CFA. Coletivamente, estes genes são relacionados a comunicação intercelular, controle meiótico,

modulação epigenética, recrutamento folicular, manutenção, estresse e respostas celulares ao estresse. Nas CC, um total de 27 genes foi diferencialmente expresso entre os grupos. As CC dos animais de B-CFA tiveram expressão elevada de genes associados ao controle meiótico (*RGS2*, *NPR3* e *NPR2*) e modulação epigenética (*DNMT3A*, *HDAC2* e *PAF1*), bem como de genes associados a funções como comunicação intercelular, divisão, respostas ao estresse, entre outras (*EGFR*, *CDK6*, *PA2G4*, *IGF1R*, *GSK3A*, *ATPL5*, *TFAM*, *PFKP*, *CASP9*, *STAT3*, *XBP1*, *HSP90AA1*, *HSPA5*, *HSPD1* e *SOD1*). Contrariamente, *FSHR*, *ARO*, *PTGS2*, *GAPDH*, *SREBF1* e *NFKB2* estavam com expressão diminuída em B-CFA comparado ao grupo A-CFA. Estes resultados indicam que células foliculares distintas possuem diferentes padrões transcricionais em fêmeas de B-CFA e A-CFA. Além disto, os animais de B-CFA apresentam maiores quantidades de estradiol circulante do que os animais de A-CFA (24,4 pg/mL ± 10,2 e 14,9 pg/mL ± 3,6, respectivamente). Apesar deste trabalho não possibilitar um estabelecimento de relação de causa-consequência, tanto os padrões transcricionais quanto de estradiol possivelmente estão associados a performances reprodutivas relatadas na literatura.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais, folículo ovariano, *Bos indicus*, oócito, células do cumulus.

ABSTRACT

DE LIMA, M. A. **Transcriptional patterns within ovarian follicular microenvironment of *Bos indicus* females with high and low antral follicular count**: 2019. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Antral Follicle Count (AFC) has been associated with reproductive performance in cattle. In taurine females, higher AFC is positively associated with pregnancy rates and greater *in vivo* and *in vitro* embryo production. Contrarily, in indicine females, AFC is negatively correlated with pregnancy rates after IVP-ET or TFAI. The biological aspects that mediate the relationship between CFA and reproduction remain unknown. Follicular development is known to be regulated by both molecular and hormonal factors. This study aimed to investigate gene expression in oocytes and cumulus cells as well to evaluate serum estradiol levels of low AFC (L-AFC) and high AFC (H-AFC) females using Nellore heifers (*Bos taurus indicus*) as experimental model. Nellore heifers (n=48) had the ovarian follicular wave synchronized. On Day 5, AFC was determined and the bottom 10 and top 10 females were assigned to experimental groups LAFC (number of follicles<30, AFC = 24 ± 4.73) and HAFC (number of follicles >60, AFC = 72.3 ± 15.67), respectively. Still on day 5, blood samples were collected, and cumulus-oocyte complexes were retrieved by ovum pick-up. Cumulus cells and oocytes were separated by pipetting. Twenty samples (polls) of 10 oocytes (one per animal) and 20 samples (polls) of cumulus cells from respective oocytes (one per animal) were used for RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression assessment of 95 genes by RT-qPCR. Means of normalized gene expression, using *PPIA* as the reference gene, were compared by Student's t-test and were considered significant when $P < 0.05$. In oocytes, a total of 11 genes were differentially expressed, including 8 upregulated in L-AFC group (*BMP15*, *HAS2*, *EGFR*, *NPR3*, *H1FOO*, *IGFBP2*, *GAPDH* and *HSF1*) and 3 downregulated in L-AFC (*TFAM*, *PRDX3* and *XBP1*) compared with H-AFC. Collectively, these genes are related to cellular communication, meiotic control, epigenetic modulation, follicular recruitment, maintenance, stress and cellular responses to stress. In cumulus cells a total of 27 genes were differentially expressed between the groups. Cumulus cells from L-AFC animals had higher expression of genes associated with meiotic control (*RGS2*, *NPR3* and *NPR2*) and epigenetic modulation (*DNMT3A*, *HDAC2* e *PAF1*), as well as genes

associated with functions as intercellular communication, division, cellular responses to stress and others (*EGFR*, *CDK6*, *PA2G4*, *IGF1R*, *GSK3A*, *ATPL5*, *TFAM*, *PFKP*, *CASP9*, *STAT3*, *XBP1*, *HSP90AA1*, *HSPA5*, *HSPD1* e *SOD1*). Contrarily *FSHR*, *ARO*, *PTGS2*, *GAPDH*, *SREBF1* e *NFKB2* were downregulated in LAFC compared with HAFC group. These results indicate that distinct cellular types within ovarian follicles have dissimilar transcriptional patterns comparing LAFC and HAFC females. In addition, B-CFA animals had higher circulating estradiol than A-CFA animals (24,4 pg/mL \pm 10,2 e 14,9 pg/mL \pm 3,6, respectively). Although this work does not allow establishing a cause-consequence relationship, both transcriptional and estradiol patterns are possibly associated with reproductive performances reported in the literature.

Keywords: Antral Follicle Count, *Bos indicus*, ovarian follicle, oocyte, cumulus cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação morfológica dos folículos ovarianos.	17
Figura 2. A formação do folículo primordial.....	20
Figura 3. Esquema demonstrativo das interações foliculares de sinalização da ativação do folículo primordial.	21
Figura 4. Esquema demonstrativo do padrão em ondas do desenvolvimento dos folículos antrais	27
Figura 5. Delineamento experimental.....	33
Figura 6. CFA e recuperação de CCOs nos grupos B-CFA e A-CFA	38
Figura 7. Genes diferencialmente expressos em oócitos e células do cumulus de novilhas com baixa ou alta CFA.	40
Figura 8. Expressão relativa dos genes diferencialmente expressos em oócitos e células do cumulus dos grupos B-CFA e A-CFA.....	42
Figura 9. Estradiol sérico em novilhas Nelore de B-CFA e A-CFA.....	43

SUMÁRIO^[LM1]

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. FOLICULOGÊNESE	16
2.1.1. A formação do folículo ovariano	18
2.1.2. O desenvolvimento folicular pré-antral	20
2.1.3. O desenvolvimento folicular antral	23
2.2. A CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS	27
2.2.1. A CFA e a performance reprodutiva.....	28
2.2.2. A CFA e outros fatores associados	29
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. LOCALIZAÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS	33
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.3. SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR OVARIANA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO, OÓCITOS E CÉLULAS DO CUMULUS	34
4.5. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....	35
4.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO SISTEMA DE MICROFLUÍDICA	36
4.7. DOSAGEM DE ESTRADIOL	37
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5. RESULTADOS	37
5.1. CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO	37
5.2. A CFA ESTÁ ASSOCIADA A PADRÕES TRANSCRICIONAIS DIFERENCIAIS EM DISTINTOS TIPOS CELULARES DO MICROAMBIENTE FOLICULAR OVARIANO	39

5.3.	ANIMAIS COM B-CFA APRESENTAM MAIORES NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL	43
6.	DISCUSSÃO	43
7.	CONCLUSÃO.....	50
8.	REFERÊNCIAS	51
9.	APÊNDICES.....	60

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, o aumento da produção de alimentos, incluindo produtos de origem animal, é uma crescente necessidade mundial. A produção de gado destinado a corte e leite pode ser melhorada por diversas estratégias, dentre elas, a correlação de características fenotípicas à performance reprodutiva de bovinos, de modo a facilitar a seleção de animais de maior interesse reprodutivo.

Uma característica fenotípica interessante para este fim é o número de folículos antrais ovarianos, pois é de fácil detecção, tem alta variabilidade entre os animais, mas alta repetibilidade no mesmo indivíduo (BURNS et al., 2005a; SILVA-SANTOS et al., 2014c). Ademais, a contagem de folículos antrais (CFA) está associada às taxas reprodutivas tanto de animais *Bos taurus* quanto de *Bos indicus* (MOROTTI et al., 2017; WATANABE et al., 2017). Por estes motivos, a CFA tem sido proposta como bom marcador fenotípico para selecionar animais com performance reprodutiva superior (SILVA-SANTOS et al., 2014d) ou para a recuperação de maior número de oócitos em programas de larga escala de produção *in vitro* de embriões (PIVE; PONTES et al., 2011).

Estudos em fêmeas taurinas relatam que a alta CFA é relacionada à maior reserva folicular (IRELAND et al., 2008a), fertilidade (IRELAND et al., 2011) e taxa de gestação (MOSSA et al., 2012; WATANABE et al., 2017), além de influenciar positivamente a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões (WATANABE et al., 2017; MOROTTI et al., 2018). Em fêmeas *Bos indicus*, por sua vez, esta relação aparenta ocorrer inversamente, pois a baixa CFA está relacionada a melhores taxas de gestação após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (SANTOS et al., 2013; MOROTTI et al., 2018) ou transferência de seus embriões (TE; (WATANABE et al., 2017), e maiores diâmetros do folículo ovariano dominante (MOROTTI et al., 2016), embora animais de alta CFA exibam maiores números de embriões produzidos por PIVE (SANTOS et al., 2016).

Apesar das constatações da relação entre a CFA e o sucesso reprodutivo, especialmente em animais *Bos taurus*, o motivo de animais apresentarem diferentes números de folículos antrais e os aspectos biológicos que intermediam a relação da CFA com a reprodução ainda são desconhecidos, principalmente em fêmeas *Bos*

indicus. Sabe-se que o desenvolvimento dos folículos ovarianos pode ser regulado tanto por fatores moleculares quanto hormonais e que o período de foliculogênese é uma etapa importante do processo reprodutivo como um todo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se fêmeas *Bos indicus* com baixa ou alta CFA divergem no padrão transcricional de diferentes tipos celulares do ambiente folicular ovariano e nos níveis séricos de estradiol (E2). O padrão transcricional de oócitos e células do cumulus (CC) foi determinado para genes com funções importantes para o desenvolvimento de células foliculares, como a comunicação intercelular, controle do aprisionamento meiótico, modulação epigenética, divisão celular, recrutamento folicular, manutenção celular, esteroidogênese, estresse celular e resposta ao estresse. Nossas hipóteses são as de que novilhas nelore com diferentes CFA apresentam distintos perfis transcricionais e níveis séricos de estradiol. Espera-se principalmente que a B-CFA esteja associada a níveis menores de transcritos relacionados a recrutamento folicular e de estradiol sérico diante do menor número de folículos deste grupo, e maiores níveis de transcritos de genes relacionados a qualidade oocitária e embrionária, diante das melhores performances reprodutivas constatadas na literatura.

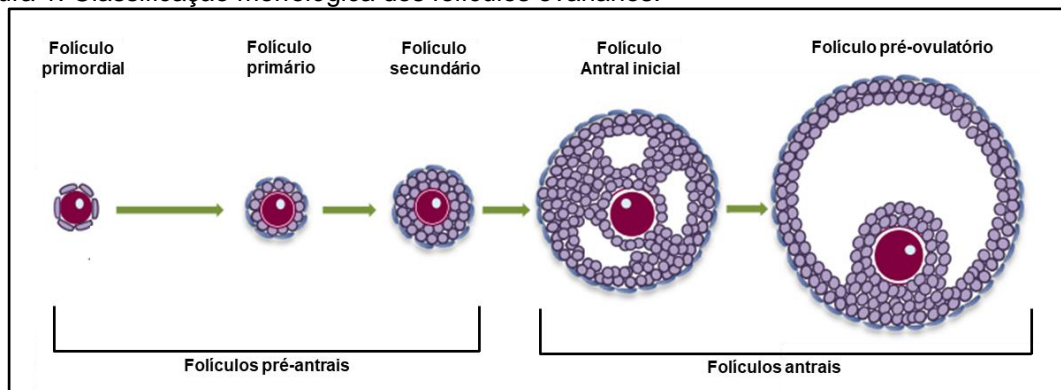
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. FOLICULOGÊNESE

O folículo é a unidade funcional do ovário de mamíferos. Nele, o gameta feminino desenvolve-se, capacita-se e matura para posterior fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (SCARAMUZZI et al., 2011). Além da oogênese, no folículo também são produzidos diversos fatores e hormônios pelas células foliculares, os quais possuem papel importante na reprodução (KNIGHT; GLISTER, 2006a; POHLER et al., 2012). Os folículos ovarianos podem ser classificados morfológicamente como folículos pré-antrais, o que se refere aos folículos primordiais, primários e secundários; ou como folículos antrais, referente

aos folículos antrais iniciais ou pré-ovulatórios (AERTS; BOLS, 2010a, 2010b; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), conforme o ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Classificação morfológica dos folículos ovarianos.



Fonte: adaptado de (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012)

A foliculogênese é um processo regulado por diversos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. Nele, há a formação e desenvolvimento da estrutura folicular e de todos os tipos celulares que a constituem, os quais atuarão diferentemente no ambiente folicular para proporcionar a preparação do oócito (WEBB et al., 2016). A maioria dos folículos virá a sofrer atresia em algum período da foliculogênese, enquanto alguns deles conseguirão atingir o seu completo desenvolvimento (GREENFIELD, 2016).

Durante os estágios de desenvolvimento folicular, tanto o diâmetro do folículo quanto do oócito é aumentado. O crescimento do oócito é decorrente do acúmulo de mitocôndrias e outras organelas, mRNAs e proteínas que serão importantes para o suporte do desenvolvimento embrionário após a fertilização (MAHROUS; YANG; CLARKE, 2012; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). O oócito sofre também modificações estruturais (DUCIBELLA et al., 1994; KIM et al., 2014) e o estabelecimento de um padrão oocitário específico de metilação do DNA (SMALLWOOD et al., 2011; TOMIZAWA; NOWACKA-WOSZUK; KELSEY, 2012).

O início da foliculogênese é dado pela formação do folículo primordial, que por sua vez é ativado, instaurando o crescimento e diferenciação do oócito e das células ao seu redor (SCARAMUZZI et al., 2011). O recrutamento e crescimento folicular inicial é modulado predominantemente por ação local de fatores intraovarianos, em uma etapa da foliculogênese que é independente de gonadotrofinas (SCARAMUZZI et al., 2011; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Os folículos

tornam-se então responsivos às gonadotrofinas e, por fim, dependentes de gonadotrofinas, fase na qual o seu crescimento ou regressão é dado em um padrão sequencial de ondas foliculares (SCARAMUZZI et al., 2011). Em bovinos, o período completo da evolução de um folículo primordial até se tornar um folículo préovulatório pode levar de 3 a 4 meses (WEBB et al., 2004), apesar de cada onda folicular ovariana durar aproximadamente entre 7 e 10 dias (MIHM et al., 2000).

2.1.1. A formação do folículo ovariano

Ainda durante a fase embrionária, os oócitos são formados a partir das células germinativas primordiais (CGPs). As CGPs originam-se no epiblasto e migram para porções extraembrionárias, na parede do saco vitelino, onde permanecem durante a organogênese (LAWSON; HAGE, 1994). Posteriormente migram de volta para porções intraembrionárias pelo intestino primitivo e mesentério, sofrendo sucessivas mitoses até chegarem à crista genital, por volta dos 35 dias de gestação em bovinos (AERTS; BOLS, 2010a; HEN; SELA-DONENFELD, 2018).

Na crista genital feminina, onde passam a ser produzidos fatores ovarianos específicos, as CGPs são diferenciadas em oogônias e são agrupadas em estruturas denominadas cistos de células germinativas (GREENFIELD, 2016). Os cistos de células germinativas, observados por volta dos 60 dias de gestação (GARVERICK et al., 2010), são estruturas fechadas em cordões ovígeros, constituídos por células cuboides pré-granulosa e circundados por uma lâmina basal (PEPLING, 2006).

Eventualmente, os oócitos dentro dos cistos de células germinativas separam-se e as células pré-granulosa que antes envolviam o cisto de célula germinativa estendem protrusões citoplasmáticas entre os oócitos, envolvendo-os individualmente (DA SILVA-BUTTKUS et al., 2008). Estas células são então denominadas células da pré-granulosa achatadas, na formação do folículo primordial (AERTS; BOLS, 2010a). Em bovinos, os folículos primordiais ovarianos podem ser encontrados ao redor do dia 90 de gestação e estudos *in vitro* sugerem que o início do seu desenvolvimento é inibido reversivelmente pelo estrógeno (YANG; FORTUNE, 2008).

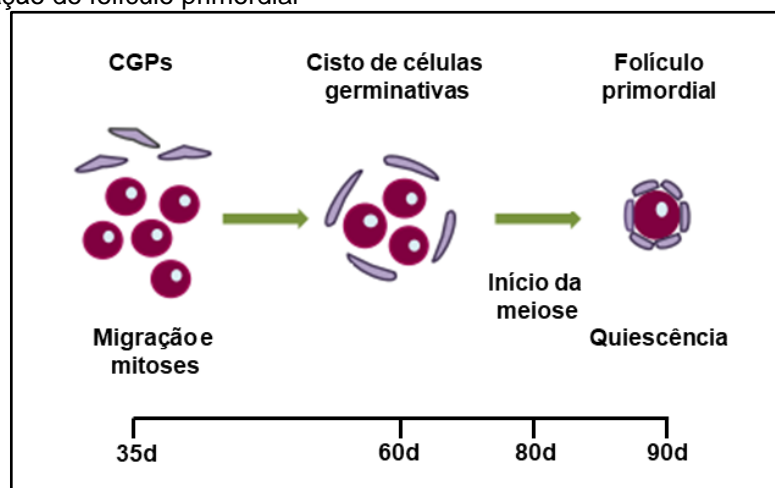
Dentro do folículo primordial, os oócitos e as células da granulosa são intimamente interligados através de complexos físicos de adesão, junções aderentes

e comunicantes (MORA et al., 2012; JORGENSEN, 2013) os quais mantêm o contato tanto das CC entre si quanto das CC com os oócitos. Esta comunicação intercelular no interior do folículo ocorre durante toda a foliculogênese, mesmo após a formação da zona pelúcida, e é extremamente importante para o desenvolvimento folicular e o crescimento dos oócitos (EL-HAYEK; CLARKE, 2016).

Pouco antes da formação dos primeiros folículos primordiais em bovinos, ao redor dos 80 dias de gestação, as oogônias começam a iniciar a meiose (YANG; FORTUNE, 2008). Contudo, a divisão meiótica iniciada durante a vida intrauterina não se completa, sendo aprisionada no estágio de diplóteno da prófase da meiose I (GREENFIELD, 2016). O núcleo do oócito aprisionado em meiose I descondensa-se e adquire capacidade transcricional, e nessa conformação passa a ser denominado vesícula germinativa (TAN et al., 2009). O bloqueio meiótico e a vesícula germinativa são mantidos até o período imediatamente anterior à ovulação, quando, em resposta ao estímulo desencadeado pelo pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), ocorre a quebra da vesícula germinativa e progressão até a metáfase da meiose II (CLARKE, 2017).

Os folículos primordiais permanecem em quiescência até o período da sua ativação (GREENFIELD, 2016). A maior parte dos folículos ativados não completará o seu desenvolvimento, sofrendo regressão e apoptose em diversos estágios da sua evolução, mas considerando um folículo ativado que virá a ovular, o seu desenvolvimento pode ser dividido em duas fases: o desenvolvimento folicular pré-antral, que incide com a evolução do folículo primordial a primário e depois secundário (AERTS; BOLS, 2010a), e o desenvolvimento folicular antral, em que o antro é formado, o folículo passa a ser recrutado em um padrão de onda folicular, adquire dominância e por fim ovula (AERTS; BOLS, 2010b; SCARAMUZZI et al., 2011).

Figura 2. A formação do folículo primordial



Fonte: adaptado de (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012)

Legenda: Por volta dos 35 dias de gestação, as CGPs em migração e sofrendo diversas mitoses chegam à crista genital. Na crista genital feminina, onde passam a ser produzidos fatores ovarianos específicos, as CGPs são diferenciadas em oogônias e são agrupadas em cistos de células germinativas, observados ao redor de 60 dias de gestação. Aos 80 dias as oogônias começam a iniciar a meiose, que será aprisionada no estágio de diplóteno da prófase da meiose I até o pico préovulatório de LH. Os oócitos presentes dentro dos cistos de células germinativas separam-se por volta do dia 90 de gestação, e são então envolvidos pelas células prégranulosa achatadas que antes envolviam o cisto de célula germinativa, formando os folículos primordiais. Os folículos primordiais ficam em quiescência até o período da sua ativação para se desenvolverem a folículos primários.

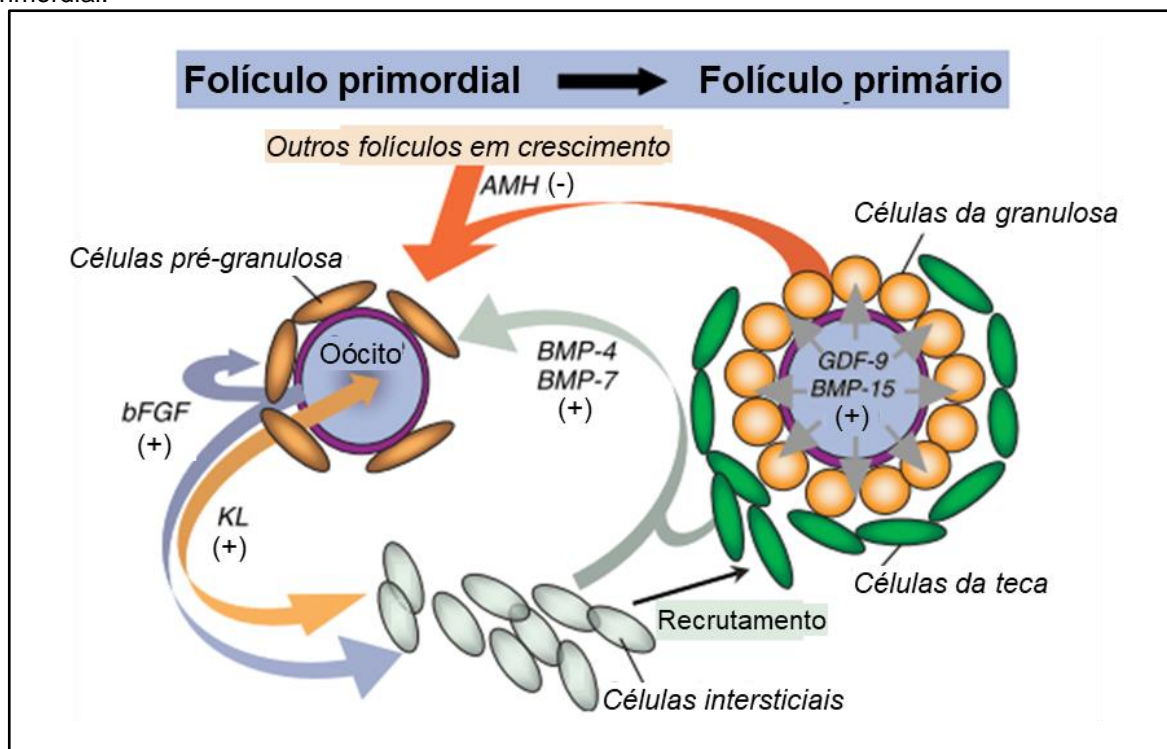
2.1.2. O desenvolvimento folicular pré-antral

O recrutamento inicial dos folículos é um processo contínuo de ativação de grupos de folículos primordiais (KNIGHT; GLISTER, 2006b). Os folículos primordiais não se desenvolvem a folículos primários imediatamente após a sua formação. Na vaca, embora os folículos primordiais sejam formados a partir dos 90 dias de gestação, os primeiros folículos primários somente são observados a partir do dia 140 de gestação (YANG; FORTUNE, 2008). Acredita-se que os folículos primordiais não tenham capacidade de sofrer ativação logo após a sua formação, além dessa ativação ser também regulada por fatores regionais inibitórios (KNIGHT; GLISTER, 2006a; ADHIKARI; LIU, 2009).

Os mecanismos que controlam a seleção dos folículos a serem ativados não são completamente conhecidos, contudo existem evidências demonstrando que a comunicação bidirecional entre os oócitos, células da granulosa e células intersticiais ovarianas é imperativa para o recrutamento e desenvolvimento normal do folículo (SKINNER, 2005; KNIGHT; GLISTER, 2006a).

Diversas moléculas têm sido relacionadas com a ativação ou inibição do folículo primordial. Como exemplos de moléculas oocitárias ativadoras, podemos citar os fatores de crescimento como o FGF (*fibroblast growth factor*; NILSSON; SKINNER, 2004) e alguns membros da superfamília TGFB (*transforming growth factor-Beta*; (NILSSON; SKINNER, 2003), por exemplo o kit ligand (KL), as BMPs (*bone morphogenetic protein*; NILSSON; SKINNER, 2004) e os GDFs (*growth differentiation factor*; NILSSON; SKINNER, 2002). Como molécula inibitória, temos o exemplo do hormônio AMH (*Anti-Mullerian Hormone*), também membro da superfamília TGF-B, que é produzido pelas células da granulosa de folículos já ativados e de estágios superiores de desenvolvimento (DURLINGER et al., 2001). O esquema demonstrativo das interações foliculares de sinalização para a ativação do folículo primordial encontra-se na Figura 3

Figura 3. Esquema demonstrativo das interações foliculares de sinalização da ativação do folículo primordial.



Fonte: adaptado de (KNIGHT; GLISTER, 2006a)

Legenda: Interações foliculares de sinalização estimulatória (+) e inibitória (-) envolvidas na transição do folículo primordial a primário. O KL (*Kit Ligand*) produzido pelas células da pré granulosa e o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) secretado pelo oócito estimulam-se mutuamente. Essas moléculas também promovem o recrutamento de células da teca a partir da população de células intersticiais circundantes. As células intersticiais e células da teca secretam BMP-4 e BMP-7, que promovem a ativação e sobrevivência do folículo. O GDF-9 e / ou BMP-15 secretados pelo oócito do folículo ativado promovem a proliferação de células da granulosa. As células da granulosa de folículos em crescimento secretam AMH que parece atuar como um refreador do recrutamento de folículos primordiais

Uma vez que os folículos primordiais são ativados, eles entram em uma fase de crescimento independente de gonadotrofinas. Em decorrência dessa ativação, as células da pré-granulosa passam de um padrão de formato achatado para um formato cuboidal, as células da teca derivadas de células semelhantes a fibroblastos presentes no estroma ovariano são recrutadas, e o oócito tem o seu tamanho aumentado, ainda permanecendo no diplóteno da prófase I da meiose enquanto cresce. Análises de expressão de folículos primários mostram que muitos genes não encontrados nos folículos primordiais são ativados durante esta fase de crescimento, incluindo genes envolvidos com função mitocondrial, comunicação celular e síntese da zona pelúcida (SCARAMUZZI et al., 2011).

As células da granulosa dos folículos primários então se dividem em diversas camadas para a formação do folículo secundário, ainda sob influência de fatores como o GDF9 e BMP15 (KNIGHT; GLISTER, 2006a). Os folículos secundários continuam a aumentar o número de suas camadas de células da granulosa e da teca, passam a depositar componentes constituintes da zona pelúcida ao redor do oócito (AERTS; BOLS, 2010b) e as células da teca interna, precisam adquirir as enzimas necessárias para a produção de andrógenos, as quais serão essenciais para a formação completa do antro (MCNATTY et al., 2007). As camadas de células da granulosa presentes mais próximas ao oócito proliferam mais rapidamente do que as camadas mais próximas à membrana basal (DA SILVA-BUTTKUS et al., 2008), o que fortalece a ideia de que fatores oocitários podem promover a proliferação das células da granulosa (GILCHRIST et al., 2006).

A ordem de desenvolvimento dos folículos durante as suas fases pré-antrais aparenta ser um processo linear principalmente controlado pelo ambiente intraovariano (KNIGHT; GLISTER, 2006a). A medida que o folículo se desenvolve, gradualmente passa a ser mais responsivo aos estímulos das gonadotrofinas e a presença do FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) começa então a estimular o folículo à produção do antro folicular (SCARAMUZZI et al., 2011).

2.1.3. O desenvolvimento folicular antral

O antro é formado por fluido folicular a partir de secreções das células da granulosa, bem como da entrada de fluido advindo do espaço extra folicular, em decorrência da dinâmica vascular (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Acredita-se que o FSH seja uma das moléculas envolvidas no processo de formação do antro folicular, apesar dos mecanismos da sua formação ainda serem pouco conhecidos (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010; WANG et al., 2018). Muitos dos folículos não sobrevivem além do estágio de estabelecimento do antro.

Conforme o antro é estabelecido, as células da granulosa que circundam o oócito são diferenciadas em CC, as quais mantêm uma associação mais direta e de suporte com o oócito, e em células da granulosa murais, cuja função é principalmente produzir esteroides (SCARAMUZZI et al., 2011). Essa diferenciação é dada por um mecanismo de contra gradiente entre os fatores secretados pelo oócito e o FSH que chega ao folículo por meio dos vasos sanguíneos presentes na camada de células da teca. Neste mecanismo, os fatores secretados pelo oócito atuam mais fortemente quanto mais adjacentes forem as células ao oócito (RONG LI et al., 2000; DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007), assim como o FSH circulante promove ações dependentes de seu gradiente nas células foliculares, que é mais alto próximo à membrana basal e decresce em direção ao interior do folículo (DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007).

Após a formação do antro folicular, o oócito aúfere a capacidade de reassumir a meiose. Entretanto, o bloqueio meiótico é mantido até o pico pré-ovulatório de LH para que o oócito adquira a completa competência de desenvolvimento, através da conclusão da formação da maquinaria citoplasmática necessária para sustentar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (SCARAMUZZI et al., 2011; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). O bloqueio meiótico é conservado pela comunicação intercelular, na qual peptídeos natriuréticos, como o NPPC, produzidos pelas células da granulosa, ligam-se aos seus receptores nas CC e no oócito, como o NPR2 e o NPR3, que por sua vez ajudam a sustentar altos níveis de AMPc dentro do oócito, mantendo-o nos estágios de vesícula germinativa durante todo o desenvolvimento folicular (ZHANG et al., 2010; CONTI et al., 2012; CLARKE, 2017).

A manutenção do bloqueio meiótico durante a foliculogênese é importante, pois a sua retomada promove a perda da comunicação física entre o oócito e as CC, que é necessária para o acúmulo de nutrientes que sustentarão o oócito até o desenvolvimento embrionário inicial, além de também promover a quebra da vesícula germinativa, em que a cromatina oocitária passa a ser inteiramente condensada e a transcrição oocitária é portanto interrompida (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; POHLER et al., 2012). Ainda durante as fases de vesículas germinativas, o oócito sofre modificações de cromatina dadas por modulações epigenéticas que ocorrem à medida que o oócito se desenvolve, alterando o seu padrão de transcrição (CLARKE, 2017).

Estudos demonstram que durante a fase antral, os folículos apresentam diferentes níveis transcricionais entre si referentes a funções importantes para o desenvolvimento das células foliculares, o que pode estar associado ou indicando um padrão de qualidade oocitária ou embrionária (UZBEKOVA et al., 2009; REIZEL; ELBAZ; DEKEL, 2010; POHLER et al., 2012; WANG et al., 2012; MAREI et al., 2014). Dentre as notáveis funções desempenhadas pelas células foliculares estão a comunicação intercelular, o controle meiótico, a modulação epigenética, o recrutamento folicular, a divisão celular, a manutenção e metabolismo celular, e os mecanismos de estresse e sua resposta, todas estas selecionadas como objeto de estudo do presente trabalho.

Dentre os folículos antrais presentes no ovário, alguns possuem respostas mais avançadas às gonadotrofinas e emergem junto a aumentos de FSH, momento em que se caracterizam como folículos dependentes de gonadotrofinas, os quais crescem ou regredem em um padrão regular de ondas sequenciais (SCARAMUZZI et al., 2011). Uma onda de folículos antrais capazes de responder ao estímulo de FSH é recrutada por um aumento sutil deste hormônio na circulação, que dura de 1 a 2 dias (MIHM et al., 2000) diante do desaparecimento momentâneo do feedback negativo do E2 e da inibina quando um folículo dominante ovula ou quando um potencial folículo dominante sofre atresia (SCARAMUZZI et al., 2011).

O aumento de FSH induz um grupo de folículos dependentes de gonadotrofinas a se diferenciarem do grupo de folículos responsivos (SCARAMUZZI et al., 2011). Os folículos em crescimento passam a produzir cada vez mais E2, elevando o seu nível de liberação conforme o avanço da onda folicular (NOSEIR, 2003). Estudos demonstram que o E2, além de atuar na regulação do ciclo fisiológico reprodutivo,

apresenta benefícios para os parâmetros reprodutivos (POHLER et al., 2012; BINELLI et al., 2014) e é capaz de influenciar no comportamento das células intrafoliculares (BEKER-VAN WOUDEBERG et al., 2004; LEE et al., 2013; BURATINI et al., 2017; SOARES et al., 2017), do oviduto (COMETTI et al., 2018; GONELLA-DIAZA et al., 2018) e do útero (PERRY; PERRY, 2008; POHLER et al., 2012; SUGIURA et al., 2018), operando através da ativação da transcrição e da síntese de proteínas (HALL; COUSE; KORACH, 2001).

Após alguns dias do recrutamento da onda folicular, um dos folículos torna-se maior do que os demais recrutados na mesma onda e é então designado como o folículo dominante, enquanto os outros folículos tornam-se subordinados, têm o seu crescimento suprimido e acabam por fim sofrendo atresia (SCARAMUZZI et al., 2011). A supressão dos folículos subordinados é dada pelo aumento de E2 e de inibina. A inibina é produzida pelas células da granulosa do folículo dominante, e é uma molécula membro da família TGFB (FINDLAY et al., 2001) que atua inibindo o crescimento dos demais folículos por diminuir a síntese e a secreção de FSH pela adeno-hipófise (ARAI et al., 1996). O E2, por sua vez, possui um efeito dose-dependente na liberação de GnRH, modificando o seu padrão de liberação no hipotálamo e a sua sensibilidade na hipófise de modo que o GnRH passará a agir para aumentar a secreção de LH e diminuir a secreção de FSH (TURZILLO; NOLAN; NETT, 1998; LOOPER et al., 2003).

Neste contexto, somente o folículo dominante, o qual foi capaz de trocar a dependência ao FSH pela dependência ao LH pode progredir no seu desenvolvimento mesmo sob baixos níveis de FSH (CAMPBELL et al., 1999). O folículo dominante em uma onda não ovulatória devido a presença do corpo lúteo, sofre atresia após 4 a 5 dias, e tem a produção de E2 e inibina diminuída, de modo a permitir o aumento de FSH e conseqüente início de uma nova onda folicular ovariana (SCARAMUZZI et al., 2011). Na ausência do corpo lúteo, o folículo dominante é capaz de se desenvolver a folículo préovulatório e ovular.

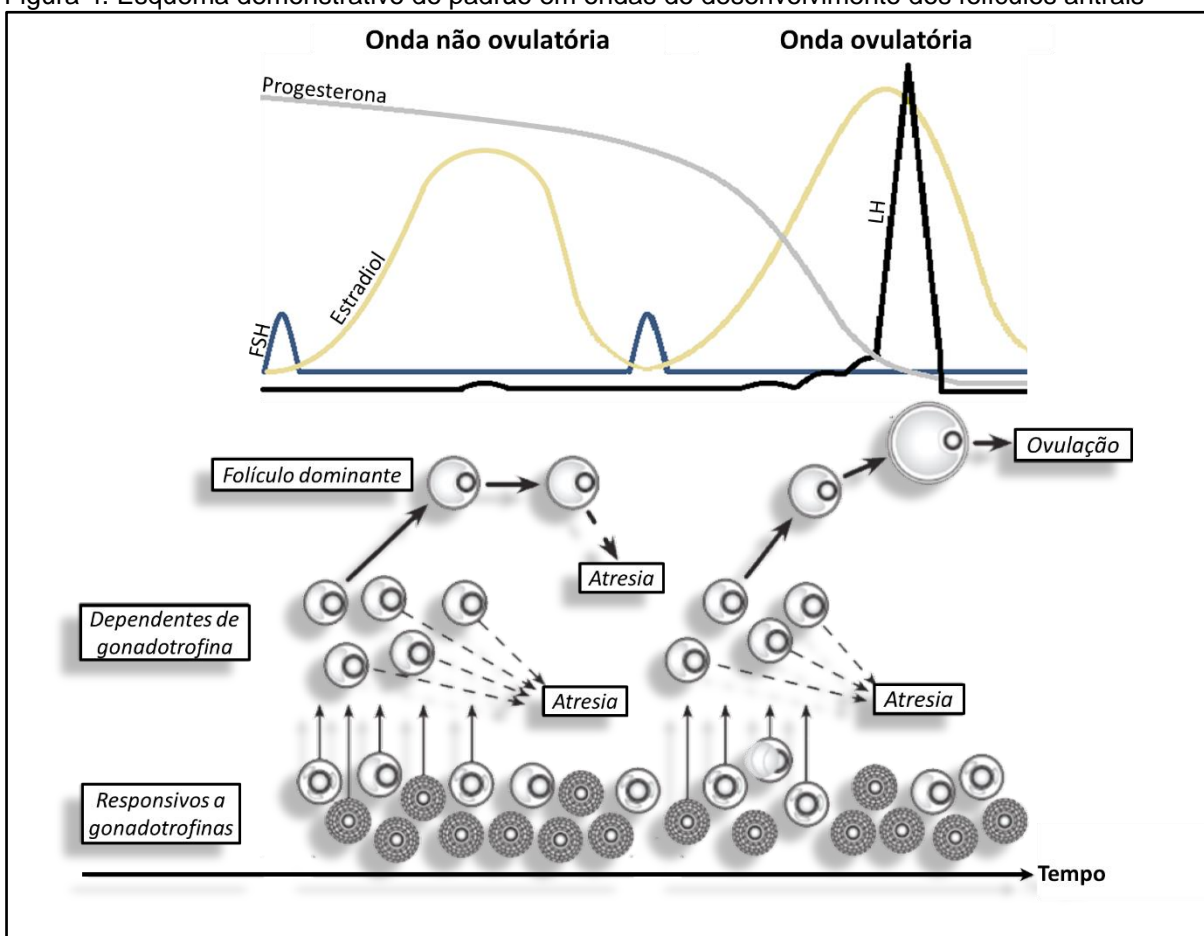
Os folículos ovulatórios são aqueles capazes de ovular estando no ambiente endócrino adequado, que inclui altos níveis de E2, baixa progesterona (ausência do corpo lúteo) e alta frequência dos pulsos de LH (SCARAMUZZI et al., 2011). A conclusão do desenvolvimento oocitário, que é concomitante à maturação meiótica, é desencadeada fisiologicamente pela liberação pulsante de altos níveis de LH. Este hormônio, além de coordenar a preparação final do oócito para que tenha o potencial

de ser fertilizado, também induz a ovulação (CONTI et al., 2012; COTICCHIO et al., 2015).

O LH tem como alvo as células da granulosa, que passam a produzir fatores de crescimento EGF (*epidermal growth factor*) (PARK et al., 2004) estimulantes da maturação oocitária e de genes associados com a expansão de CC, como por exemplo o HAS2, PTGS2 e TNFAIP (HSIEH; ZAMAH; CONTI, 2009). O estímulo da maturação oocitária e expansão das CC dado pela via dos EGFs é mediado pela sua ligação aos receptores de EGF (EGFR) presentes no oócito e nas CC (ZHANG; OUYANG; XIA, 2009). Esta ligação promove o fechamento da comunicação celular devido às CC secretarem uma matriz para o meio extracelular, no processo de expansão do cumulus, que separa fisicamente as células individualmente umas das outras e também do oócito (RUSSELL; SALUSTRI, 2006). Nesta parada de comunicação intercelular, o cAMP intraoocitário diminui, desencadeando o desbloqueio da meiose (DEKEL, 1988).

Na retomada da meiose, concomitante à maturação oocitária, o ciclo celular avança e a membrana nuclear é desmontada, um processo denominado quebra da vesícula germinativa, em que os cromossomos ficam totalmente condensados e o primeiro fuso meiótico é montado (HUANG; WELLS, 2011). O fuso migra do centro do oócito para sua periferia e a primeira divisão meiótica ocorre, gerando a extrusão do primeiro corpúsculo polar (BENNABI; TERRET; VERLHAC, 2016). Os cromossomos remanescentes no oócito então se organizam no segundo fuso meiótico na metáfase II. Além desses eventos nucleares, ocorrem também alterações citoplasmáticas, onde parte dos mRNAs se tornam traducionalmente ativos, enquanto outros se tornam silenciados (KANG; HAN, 2011; SUSOR et al., 2015). Os grânulos corticais completam a sua migração para a periferia do oócito (CHEESEMAN et al., 2016) e outros eventos ultraestruturais, como a agregação de mitocôndrias ao redor do fuso, também ocorrem (VAN BLERKOM, 2011) à espera do momento da fecundação.

Figura 4. Esquema demonstrativo do padrão em ondas do desenvolvimento dos folículos antrais



Fonte: adaptado de (SCARAMUZZI et al., 2011)

Legenda: Conforme o folículo ovariano se desenvolve, adquire uma crescente sensibilidade às ações das gonadotrofinas, passando primeiramente por um estágio responsivo aos hormônios sexuais e depois dependente destes hormônios. O FSH (linha azul) é liberado pela hipófise quando os níveis de E2 (linha amarela) encontram-se baixos. A onda folicular ovariana nasce sob a influência do FSH, que estimula os folículos mais responsivos à gonadotrofina, os quais tornam-se dependentes de gonadotrofinas. Os folículos em crescimento passam a produzir cada vez mais E2. Um dos folículos é selecionado como dominante e passa a secretar altas quantidades de E2 e inibina, promovendo a supressão do FSH, e conseqüentemente levando os folículos subordinados à atresia. Na presença de altos níveis de progesterona (produzida pelo corpo lúteo e representada pela linha cinza) em uma onda folicular não ovulatória, o folículo dominante torna-se atrético após 4-5 dias, secretando menos estradiol e inibina para que o FSH possa aumentar e iniciar uma nova onda folicular. Numa onda folicular ovulatória, os níveis de progesterona caem, o pico de LH ocorre e o folículo préovulatório é então capaz de ovular, liberando o oócito do folículo para uma possível fecundação.

2.2. A CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

A contagem de folículos antrais (CFA) ovarianos é uma característica que apresenta alta variabilidade entre as fêmeas bovinas (BURNS et al., 2005a). Estudos

relatam que apesar da variabilidade entre diferentes animais, existe uma alta repetibilidade da quantidade de folículos antrais no mesmo indivíduo (BURNS et al., 2005a; SILVA-SANTOS et al., 2014d). Além disto, a CFA é uma característica de fácil detecção, demandando apenas a utilização de um equipamento de ultrassonografia. Devido às razões citadas anteriormente, a CFA despertou o interesse de diversos pesquisadores que, originalmente em fêmeas taurinas e mais tarde em zebuínas, efetuaram avaliações para a classificação das fêmeas em baixa, intermediária e alta CFA que também permitiram a observação de que a repetibilidade individual da quantidade de folículos antrais ovarianos era mantida independentemente de fatores como a estação do ano, a idade ou status de lactação dos animais (BURNS et al., 2005a).

A partir de então, com a expectativa da probabilidade do emprego da CFA como marcador fenotípico de características de interesse, grupos de pesquisa passaram a buscar correlações entre a CFA e diversos parâmetros reprodutivos e produtivos, constatando a presença de algumas dessas correlações.

2.2.1. A CFA e a performance reprodutiva

A população ovariana de folículos antrais foi inicialmente apontada como um possível preditivo de performance reprodutiva em fêmeas *Bos taurus* (BURNS et al., 2005a; IRELAND et al., 2007). A partir de então, passou a ser utilizada como objeto de muitas pesquisas e tem mostrado uma aplicabilidade interessante no cenário produtivo, nas biotecnologias reprodutivas (IRELAND et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014c, 2014d), e na seleção de vacas doadoras de embriões em programas de larga escala de produção de embriões in vitro (*PIVE*; (PONTES et al., 2011). A partir destes trabalhos, há a sugestão de que a CFA seja relacionada a diversos aspectos da reprodução, sendo capaz de promover uma influência direta ou indireta na performance reprodutiva de bovinos (IRELAND et al., 2008a; MOROTTI et al., 2018).

Até então, é bem estabelecido pela literatura que fêmeas taurinas de alta CFA possuem melhores parâmetros reprodutivos, como por exemplo taxas de gestação mais elevadas (MOSSA et al., 2012; WATANABE et al., 2017); oócitos morfológicamente mais saudáveis (IRELAND et al., 2008a) e fertilizáveis (NAGAI et

al., 2016); e maior produção *in vivo* de embriões (IRELAND et al., 2007), sendo estes embriões também de maior qualidade (SILVA-SANTOS et al., 2014a). Além disso, fêmeas *Bos taurus* com alta CFA têm mostrado melhores respostas às biotecnologias reprodutivas aplicadas *in vivo* e *in vitro*, tanto em números quanto em eficiência, pois possuem maior taxa de prenhez na inseminação artificial (IA; (MOSSA et al., 2012), maior responsividade à protocolos de superovulação (IRELAND et al., 2007) e também são capazes de produzir maior número de embriões na PIVE, sendo essa produção também mais eficiente em suas taxas (WATANABE et al., 2017) comparado às fêmeas taurinas de baixa CFA.

Quando a influência da CFA passou então a ser estudada em animais *Bos indicus*, os pesquisadores constataram que esta relação aparenta ocorrer, em partes, em um padrão inverso do referido até então nos rebanhos taurinos, pois foram relatados em vacas indicinas de baixa CFA melhores taxas de gestação após IATF (SANTOS et al., 2013; MOROTTI et al., 2018) ou transferência de embriões (TE) utilizando seus oócitos para a PIVE (WATANABE et al., 2017), embora fêmeas *Bos indicus* de alta CFA, assim como o observado em fêmeas *Bos taurus*, exibam maiores números de embriões produzidos por PIVE (SANTOS et al., 2016).

2.2.2. A CFA e outros fatores associados

Além da analogia entre a CFA e a performance reprodutiva, houve também a tentativa da sua associação com performances zootécnicas de mérito genético, com o intuito de utilizar esta característica fenotípica em programas de melhoramento genético. O estudo de MOROTTI et al. (2016) demonstrou que a CFA pode ser levemente associada à precocidade de acabamento ao final do desmame em novilhas Braford (3/8 Nelore x 5/8 Hereford). Um trabalho com fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*), demonstrou que a CFA exibe de baixa a moderada herdabilidade, que está relacionada à porcentagem de gordura no leite, mas não com a quantidade da sua produção (WALSH et al., 2014). Devido aos parâmetros de produção de carne e leite serem pouco afetados pela CFA, e parâmetros reprodutivos serem claramente vinculados a esta característica, é mais perspicaz utilizar o número de folículos antrais como um critério secundário de seleção dos animais de produção e, no contexto da

reprodução, focar o seu emprego como ferramenta de manejo para as biotecnologias reprodutivas (MOROTTI et al., 2017).

O significado biológico, bem como os motivos pelos quais a CFA é variável entre os animais, constante no mesmo indivíduo ou está relacionada à performance reprodutiva ainda são ignorados. Uma vez que ainda não existe a compreensão dos mecanismos que levam a CFA a ter um impacto nas performances reprodutivas, estudiosos tentam encontrar alguns fatores que possam vir a ser prováveis reguladores da CFA ou que possam estar relacionados a esta característica fenotípica. Uma abordagem interessante utilizada é o estudo de características que sabidamente implicam vantagens reprodutivas como possíveis fatores associados ao número de folículos ovarianos, tais quais fatores maternos; diferenças morfológicas, moleculares e de comportamento das células foliculares, do ambiente ovidutal e uterino; além de fatores hormonais.

De acordo com o abordado anteriormente, sabemos que a formação dos folículos primordiais é dada ainda durante o período gestacional nos bovinos e, por isso, o ambiente materno no qual o feto é encontrado nesse período é um provável influenciador do tamanho da reserva folicular ovariana a ser formada, ou seja, do número total de folículos primordiais estabelecidos no ovário (EVANS et al., 2012). Partindo desta premissa, um estudo em fêmeas *Bos taurus* constatou a relação entre o estado nutricional da mãe e o número de folículos primordiais formados durante a vida de seu feto, em que a restrição alimentar foi capaz de diminuir cerca de 60% da reserva folicular ovariana (MOSSA et al., 2009). Apesar de desconhecido o motivo, é importante ressaltar que a reserva folicular está diretamente relacionada com a CFA em animais *Bos taurus* (IRELAND et al., 2011), mas não se altera em fêmeas *Bos indicus* de alta ou baixa CFA (SILVA-SANTOS et al., 2014b).

Além da reserva folicular, outros parâmetros morfológicos considerados importantes para a reprodução são diferenciados dependendo do número de folículos antrais presentes no ovário. Como exemplo, foram observados em fêmeas taurinas de alta CFA maior espessura endometrial (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009), ovários de tamanhos maiores (IRELAND et al., 2008a) e maior vascularização dos folículos ovarianos (TESSARO et al., 2011), enquanto em fêmeas indicinas de baixa CFA demonstram maior diâmetro do folículo dominante no momento da IATF (MOROTTI et al., 2018), sendo todos estes quesitos associados à melhor qualidade reprodutiva. Ademais, vacas Nelore de baixa CFA possuem também uma maior taxa de

proliferação das células foliculares, característica a qual é indicada como um possível mensurador fisiológico da atividade ovariana (MACHADO et al., 2017).

Com relação aos padrões hormonais, estudos demonstram que os níveis de hormônio anti-Muleriano (AMH) e progesterona são impactados pela CFA. O AMH é sintetizado pelas células da granulosa dos folículos préantrais e antrais e é reconhecido como um indicador confiável de atividade ovariana e capacidade de resposta a protocolos de superestimulação para a coleta de oócitos a serem utilizados na PIVE (RICO et al., 2009; BARUSELLI et al., 2015). O AMH é considerado um ótimo marcador endócrino de CFA, uma vez que tanto em animais *Bos taurus* (IRELAND et al., 2008a), quanto em animais *Bos indicus* (BATISTA et al., 2014), fêmeas classificadas como de alta CFA demonstram maiores concentrações de AMH, quando comparadas às de baixa CFA.

A progesterona, por sua vez, é um hormônio produzido pelo corpo lúteo, necessário para a manutenção da gestação dos animais domésticos, bem como para o preparo adequado do ambiente uterino capaz de sustentar o desenvolvimento embrionário e fetal (POHLER et al., 2012). Baixas concentrações deste hormônio são associadas ao menor desenvolvimento do endométrio e à mortalidade embrionária (DISKIN; MORRIS, 2008; MENCHACA et al., 2018). Estudos em fêmeas *Bos taurus* relatam maiores concentrações de progesterona circulante em animais com alta CFA durante o diestro e gestação do que animais com baixa CFA (IRELAND et al., 2011; EVANS et al., 2012; MARTINEZ et al., 2016), o que foi associado com uma menor capacidade de produção de progesterona, enzimas do processo de esteroidogênese e receptores de LH das células da granulosa e do corpo lúteo de animais de baixa CFA (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

Outra maneira utilizada para a avaliação da atividade ovariana de animais com diferentes quantidades de folículos antrais é a investigação de padrões moleculares do ambiente folicular ovariano. Um estudo recente realizado em CC e da granulosa de vacas Nelore relatou que a CFA está associada à diferenças moleculares vinculadas à regulação da maturação oocitária, retomada da meiose e expansão do cumulus, onde por exemplo as CC dos animais com baixa CFA apresentam expressões mais elevadas de *NPR2* e *NPR3*, genes envolvidos no controle da meiose, e também de *STAT3*, um gene participante do processo de maturação oocitária e proliferação celular (ROSA et al., 2018). Células da granulosa e da teca em animais taurinos, também tem o seu padrão molecular alterado dependendo da quantidade de

folículos ovarianos, uma vez que análises quantitativas de eNOS, uma proteína angiogênica, demonstram que esta se encontra elevada em folículos de animais de alta CFA (TESSARO et al., 2011).

Através dos resultados de trabalhos como os citados anteriormente nesta revisão, muitos avanços foram obtidos a respeito da relação entre a CFA e a performance reprodutiva. Contudo, os mecanismos biológicos e fisiológicos que formam a população de folículos antrais e a levam a diferentes performances reprodutivas provavelmente envolvem diversas implicações na função ovariana ainda ignoradas, sobretudo no que se diz respeito às diferentes células do compartimento folicular. Diante disto, avaliar os padrões de expressão de genes relacionados a importantes funções das células foliculares, bem como avaliar níveis de outras gonadotrofinas como o E2, sabendo que este age por vias de ativação de transcrição e está relacionado com performance reprodutiva, podem trazer contribuições relevantes para o maior conhecimento acerca da característica fenotípica de CFA e a sua influência na funcionalidade do ambiente folicular ovariano e conseqüentemente no processo reprodutivo como um todo.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram investigar a associação entre a CFA em fêmeas nelore (*Bos indicus*), e o padrão transcricional - em oócitos e células do cumulus - de genes importantes para o desenvolvimento folicular, bem como avaliar se existe uma relação entre a CFA e os níveis séricos de E2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo 8968070518 e foi realizado de acordo com a Lei 11.794 de 8 de outubro de

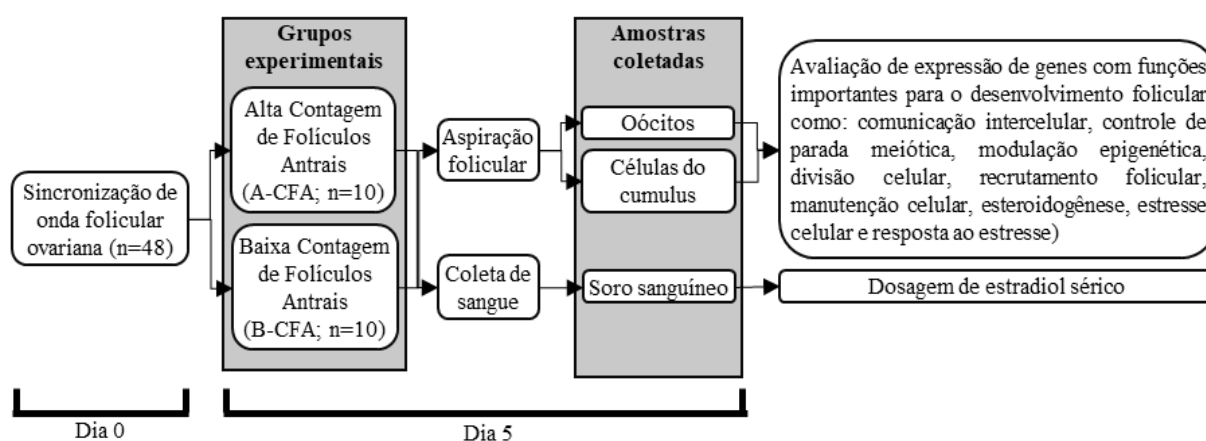
2008, Decreto 6899 de 15 de julho 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

4.1. LOCALIZAÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos no campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo, localizado na cidade de Pirassununga-Brasil, na latitude de 21° 59' 46" S e longitude de 47° 25' 33" W. Os animais foram manejados em novembro de 2016, durante o período usual da estação de monta de gado de corte na América do Sul, que coincide com o verão. Neste período e localização há altos níveis de precipitação e temperatura geralmente variando entre 20 a 30°C. As novilhas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéico-energética (100g/100kg) e água disponível *ad libitum*.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 5. Delineamento experimental



Fonte: (Lima, M. A. 2019)

Legenda: Um número de 48 novilhas nelore teve a onda folicular ovariana sincronizada. No dia 5 (D5) do protocolo, a contagem de foliculos antrais (CFA) foi realizada por exame ultrassonográfico. Os 10 animais com menor e os 10 com maior número de foliculos dentre os 48 avaliados foram selecionados respectivamente para os grupos experimentais de baixa CFA (B-CFA, número de foliculos <30) e alta CFA (A-CFA, número de foliculos >60). Ainda no dia 5, amostras de sangue foram coletadas e complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassom

("ovum pick-up" - OPU). As amostras de sangue foram centrifugadas para a obtenção de soro sanguíneo. As células do cumulus e oócitos desnudos foram separados dos CCOs por pipetagens. Pools de 10 oócitos, pools das células do cumulus dos 10 CCOs e amostras de soro sanguíneo dos animais de cada grupo foram armazenados separadamente a -80°C até análises posteriores. As análises incluíram a determinação dos níveis séricos de estradiol e avaliação transcricional em oócitos e células do cumulus de genes com funções importantes para o desenvolvimento das células foliculares como comunicação intercelular, controle de parada meiótica, modulação epigenética, divisão celular, recrutamento folicular, manutenção celular, esteroidogênese, estresse celular e resposta ao estresse.

4.3. SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR OVARIANA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

No primeiro dia (Dia 0) de sincronização da onda folicular ovariana, 48 novilhas Nelore com idade entre 23 e 27 meses e escore corporal entre 3,5 e 4,5 (em uma escala de 5) receberam 1 mg de benzoato estradiol (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal) e implantes de dispositivos intravaginais de liberação de progesterona (DILP) (Sincrogest, Ourofino Saúde Animal). No dia 5, o DILP foi removido e a CFA (contagem de folículos antrais) foi realizada. Para a realização da CFA, foi feita a ultrassonografia transretal com transdutor linear (Mindray® M5) para escanear os ovários (esquerdo e direito) de cada animal e os folículos antrais (≥ 3 mm) foram contados como descrito anteriormente (BURNS et al., 2005b; IRELAND et al., 2008b). Dos 48 animais, os 10 de menor CFA formaram o grupo de animais com baixa CFA (B-CFA) e os 10 de maior CFA formaram o grupo de alta CFA (A-CFA).

4.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO, OÓCITOS E CÉLULAS DO CUMULUS

Ainda no dia 5, amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea em tubos de vácuo siliconizados (Labor Import) e o soro sanguíneo foi obtido por centrifugação das amostras de sangue a $1139 \times G$ (1600 RPM) por 40 minutos e separação do sobrenadante, o qual foi armazenado a -80°C até análises posteriores.

No mesmo dia, os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassom ('ovum pick-up' – OPU). Para a realização do

procedimento de OPU, os animais foram submetidos à anestesia epidural, aplicando 3 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (7mg/Kg; Lidovet) entre a última vertebra sacral e a primeira vértebra coccígea. Após a perda do reflexo da cauda, as fezes foram manualmente removidas da ampola retal e a região vulvar e perineal foi higienizada com água. Então, uma guia de aspiração folicular (WTA, Cravinhos-SP, Brasil) com uma probe microconvexa de 6,5 MHz probe (Mindray® DP 2200) foi introduzida à vagina. Todos os folículos antrais de cada animal foram aspirados com um sistema de agulha descartável (20 G, 0.9 x 40 mm; Terumo, Europe NV, Belgium) acoplada à linha de aspiração de Teflon (1,7 mm). O sistema de aspiração operou a uma pressão negativa entre 12 e 15 mL de água por minuto (80 a 90 mmHg) produzido por uma bomba de vácuo. O material dos folículos aspirados foi coletado em tubo cônico de 50 mL (Corning) contendo 15 mL de PBS (DPBS; Nutricell Nutrientes celulares ®) e heparina sódica (5000UI / L, Parinex ®, Hypolabor) mantida a 37°C em um aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) durante a OPU.

Os CCOs foram coletados do conteúdo do tubo usando um filtro coletor de FIV de 75 µm. Os CCOs foram selecionados, contados e separados em pools de 10 CCOs de grau I, II e III respeitando a proporcionalidade do seu respectivo grupo (alta e baixa CFA). Células do cumulus e oócitos foram então separados por pipetagens sucessivas até o desnudamento completo dos oócitos. Pools de 10 oócitos desnudos e pools das células cumulus dos 10 CCOs de cada animal foram armazenados separadamente a -80°C até análises posteriores.

4.5. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

As amostras dos pools de 10 oócitos e das CC dos 10 CCOs foram descongeladas e submetidas ao protocolo de extração de RNA utilizando o TRI-reagent (Molecular Research Center, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi tratado com DNase I (Life Technologies) para eliminar eventuais contaminações com DNA genômico. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total dos pools utilizando o Kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO SISTEMA DE MICROFLUÍDICA

A análise da expressão gênica em oócitos e CC de animais com baixa e alta CFA foi realizada utilizando os Ensaios TaqMan® da Applied Biosystems™ específicos para bovinos. Foi analisada a abundância de mRNAs de 95 genes, relacionados à comunicação intercelular, controle de parada meiótica, modulação epigenética, divisão celular, recrutamento folicular, manutenção celular, esteroidogênese, estresse celular e resposta ao estresse.

Antes da ciclagem térmica de qPCR, cada amostra foi submetida a um processo de pré-amplificação específico da sequência, de acordo com o seguinte: 1,25 µL da mistura de ensaio (o ensaio de Taqman® foi diluído para uma concentração final de 0,2X para cada um dos ensaios), 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, # 4391128) e 1,25 µL cDNA. O início das reações foi realizado a 95 °C por 10 minutos, seguido da etapa de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e amplificação a 60 °C por 4 minutos por 14 ciclos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 5 vezes antes da análise de RT-qPCR. Para a análise da expressão gênica, a solução de amostra preparada consistiu em 2,25 µL cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 µL de reagente 20X GE Sample Loading (Fluidigm); e a solução de ensaio: 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 µL of 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). O chip 96,96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) foi usado para coleta de dados. Após o condicionamento, o chip foi carregado com 5 µL de cada solução de ensaio e 5 µL de cada solução de amostra. A termociclagem do qPCR foi realizada no Sistema Biomark HD (Fluidigm, São Francisco, CA, EUA) utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96 Standard, que consistiu em uma etapa de Thermal Mix (50°C por 2 minutos, 70°C por 20 minutos e 25°C por 10 minutos) seguido por um estágio Hot Start (50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos), anelamento e extensão do primer (60°C por 60 segundos). O *PPIA* foi o gene selecionado como controle interno para a normalização dos valores de CT. Os valores de expressão foram calculados utilizando o método de $2^{-\Delta Ct}$.

4.7. DOSAGEM DE ESTRADIOL

O E2 sérico das novilhas de B-CFA e A-CFA foi mensurado a partir da técnica de quimioluminescência (ADVIA Centaur®- Siemens) pelo laboratório de análises Pasin (Santa Maria-RS). O ensaio é feito automaticamente pelo sistema, segundo informações do fabricante e possui a sensibilidade de detecção entre 11,8 a 3000 pg/mL.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores referentes aos níveis séricos de E2 e de expressão gênica foram submetidos a ANOVA respeitando-se critérios de normalidade e homocedasticidade. As médias foram comparadas pelo teste t-student. Valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

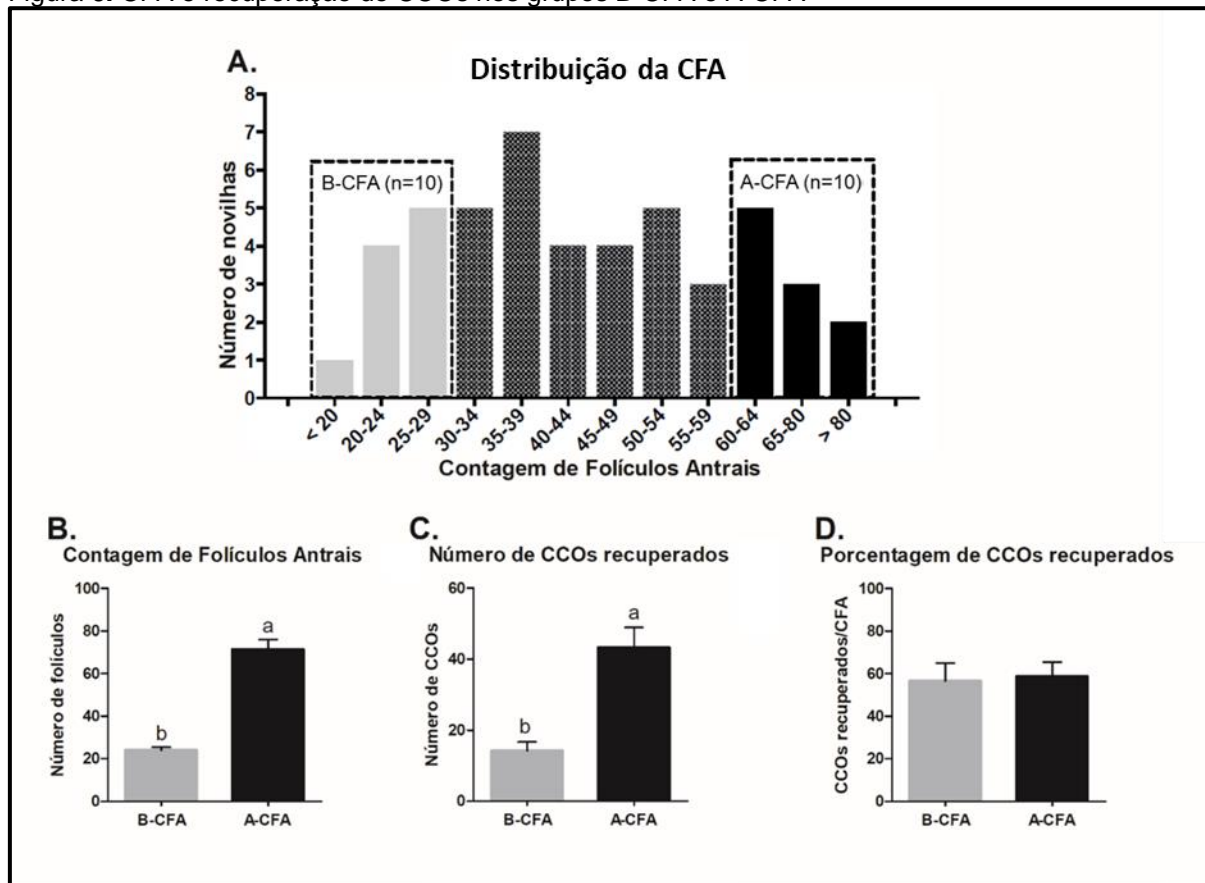
5. RESULTADOS

5.1. CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO

A partir da determinação da CFA em 48 novilhas Nelore, foram formados os grupos experimentais correspondentes aos animais de baixa CFA com os 10 animais de menor CFA (grupo B-CFA, número de folículos < 30 , $CFA = 24 \pm 4,73$, CFA variando entre 14 a 29 folículos) e aos animais de alta CFA com os 10 animais de maior CFA (grupo A-CFA, número de folículos > 60 ; $CFA = 72,3 \pm 15,67$, CFA variando entre 60 a 107 folículos) (Figura 6A e 6B). Também foram determinados o número e a porcentagem de CCOs recuperados por OPU dos animais dos dois grupos. O grupo B-CFA apresentou menor ($p \leq 0,05$) número de CCOs recuperados que o grupo de A-

CFA ($14,1 \text{ CCOs} \pm 8,2$ e $43,2 \text{ CCOs} \pm 18,3$, respectivamente; Figura 6C), mas a porcentagem de CCOs recuperados foi semelhante ($p > 0,05$) entre B-CFA e A-CFA ($58,8\% \pm 21,3$ e $56,6\% \pm 26,8$, respectivamente; Figura 6D).

Figura 6. CFA e recuperação de CCOs nos grupos B-CFA e A-CFA



Fonte: (Lima, M. A. 2019)

Legenda: (A) Histograma representando a frequência de distribuição da Contagem de Folículos Antrais considerando as 48 novilhas avaliadas. Os retângulos tracejados indicam os grupos experimentais com os 10 animais de menor (B-CFA) e maior (A-CFA) contagem de folículos antrais ovarianos. (B) Contagem de Folículos Antrais, (C) número de complexos cumulus-oócito (CCOs) recuperados e (D) porcentagem (número de CCOs/número de folículos x 100) de CCOs recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassom dos grupos B-CFA (n=10) e A-CFA (n=10) no dia 5 da sincronização folicular ovariana. Letras diferentes (a e b) indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). As barras cinzas e pretas representam respectivamente as médias dos grupos B-CFA e A-CFA. As barras de erro representam o erro padrão da média.

5.2. A CFA ESTÁ ASSOCIADA A PADRÕES TRANSCRICIONAIS DIFERENCIAIS EM DISTINTOS TIPOS CELULARES DO MICROAMBIENTE FOLICULAR OVARIANO

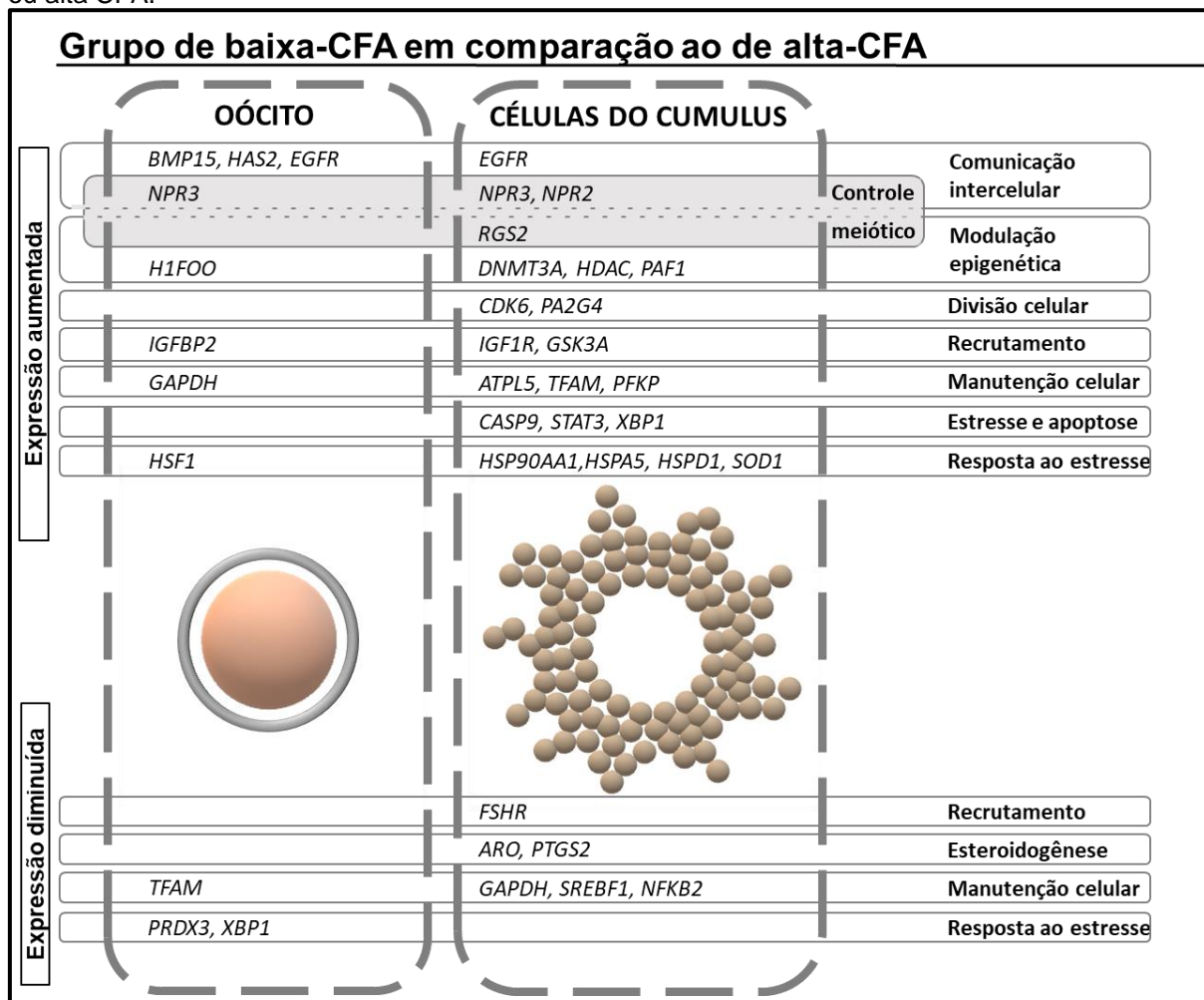
Para avaliar se existe um padrão transcricional diferente de genes importantes para o desenvolvimento das células foliculares entre os oócitos e células cumulus dos grupos de B-CFA e A-CFA, 95 genes de diversas funções celulares foram avaliados. Dentre os transcritos estudados estão genes envolvidos na comunicação intercelular, controle de parada meiótica, modulação epigenética, divisão celular, recrutamento folicular, manutenção, esteroidogênese, estresse celular e resposta ao estresse.

Tanto os oócitos quanto as CC de animais com B-CFA e A-CFA apresentaram padrões transccripcionais diferentes. Um resumo dos resultados relativos aos genes alterados entre oócitos e células cumulus de novilhas de B-CFA e A-CFA é apresentado na Figura 7, a qual ilustra os genes com expressão aumentada ou diminuída nos oócitos e CC do grupo B-CFA em relação ao grupo A-CFA. Os genes estão agrupados de acordo com suas funções.

A expressão relativa dos genes diferencialmente expressos nos oócitos ou células cumulus das novilhas de B-CFA e A-CFA estão apresentados na Figura 8.

A média, o desvio padrão, o número de amostras com expressão detectada e o valor de p relativo à expressão de todos os genes analisados nos oócitos e CC dos animais dos grupos B-CFA e A-CFA estão dispostos no Apêndice A.

Figura 7. Genes diferencialmente expressos em oócitos e células do cumulus de novilhas com baixa ou alta CFA.



Fonte: Lima, M. A., 2019.

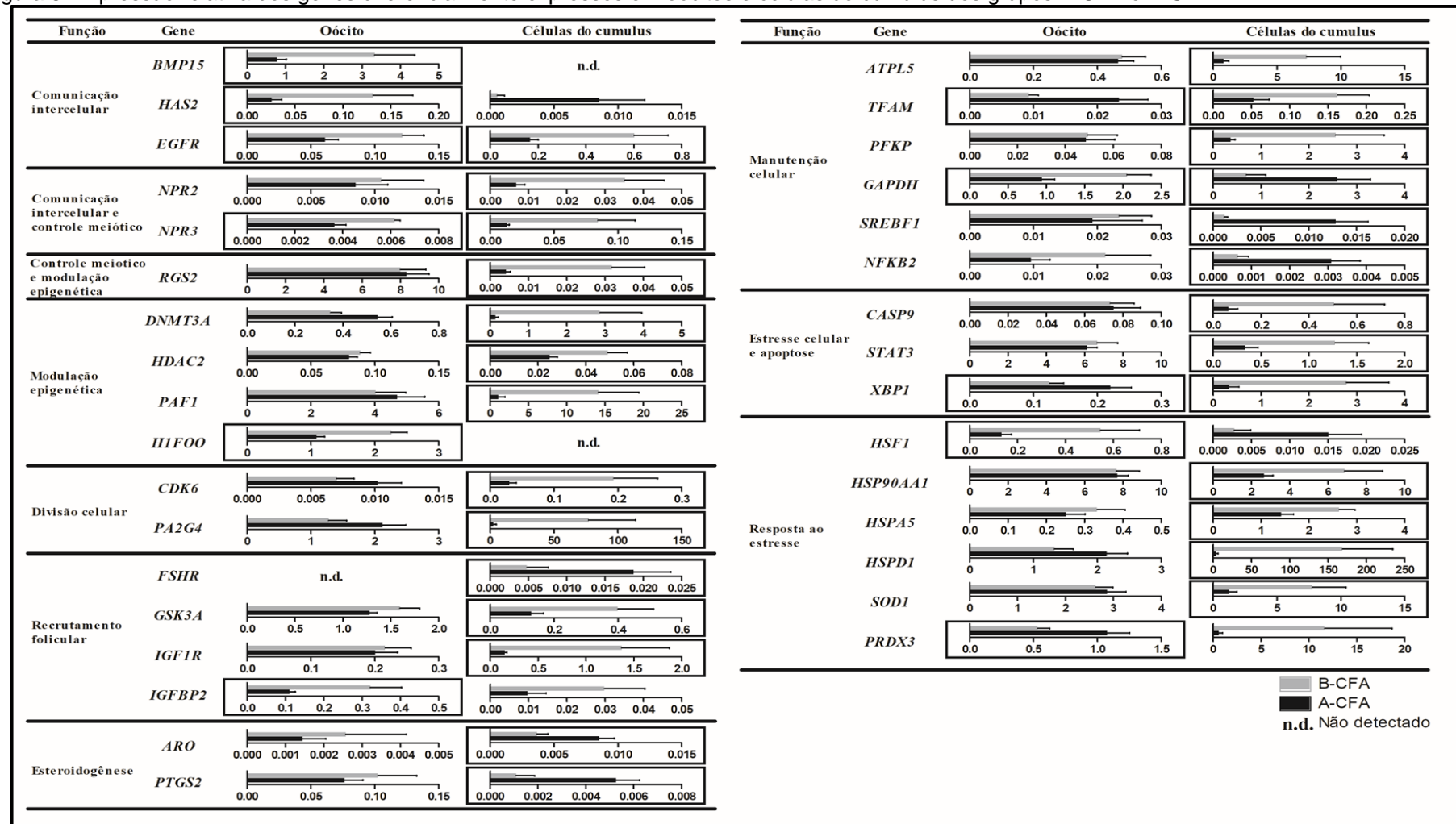
Legenda: As diferenças estão indicadas quanto à expressão aumentada ou diminuída no grupo de B-CFA em comparação ao grupo de B-CFA. O aumento ou diminuição da expressão relativa está indicado à esquerda. Os tipos celulares (oócito ou células do cumulus) estão isolados por retângulos tracejados. Os genes diferencialmente expressos encontram-se dentro do retângulo tracejado do respectivo tipo celular. Os retângulos de linha sólida correspondem às funções dos genes, conforme indicado à direita. Os genes relacionados ao controle meiótico estão representados no retângulo cinza sobreposto aos retângulos das funções de comunicação intercelular e de modulação epigenética, devido às funções interligadas destes genes.

Nos oócitos, um total de 11 genes foram diferentemente expressos entre os grupos. Genes de comunicação intercelular (*BMP15*, *HAS2* e *EGFR*), de comunicação intercelular envolvidos com o controle meiótico (*NPR3*), de modulação epigenética (*H1FOO*) e recrutamento folicular (*IGFBP2*) estavam aumentados nos grupos de B-CFA. No mesmo grupo, genes relacionados a manutenção celular e resposta ao estresse celular tiveram expressões aumentadas (*GAPDH* e *TFAM*, respectivamente) mas também diminuídas (*HSF1* e *PRDX3*, respectivamente), enquanto o gene *XBP1*,

relativo à função de estresse celular e apoptose, apresentou-se com a expressão diminuída, comparando-se ao grupo de A-CFA.

As CC representaram o compartimento intrafolicular com maior variação transcricional em função da CFA, apresentando 27 genes diferentemente expressos entre os grupos. Assim como nos oócitos, as CC dos animais de B-CFA apresentaram regulação positiva de genes relacionados à comunicação intercelular (*EGFR*), de comunicação intercelular envolvidos com o controle meiótico (*NPR3* e *NPR2*) e modulação epigenética (*DNMT3A*, *HDAC2*, *PAF1*), mas também apresentaram aumento de expressão de genes relacionados à divisão celular (*CDK6*, *PA2G4*), estresse celular e apoptose (*CASP9*, *STAT3*, *XBP1*), bem como de resposta ao estresse (*HSP90AA1*, *HSPA5*, *HSPD1*, *SOD1*). Houveram expressões gênicas aumentadas e diminuídas nas CC do grupo de B-CFA das funções de recrutamento folicular (os genes *IGF1R* e *GSK3A* apresentaram-se aumentados enquanto o gene *FSHR* estava com expressão diminuída) e de manutenção celular (*ATPL5*, *TFAM* e *PFKP* elevados, enquanto *GAPDH*, *SREBF1* e *NFKB2* encontravam-se diminuídos). Os genes relacionados à esteroidogênese (*ARO*, *PTGS2*) encontravam-se com menores padrões de expressão no grupo de B-CFA comparando-se ao grupo de A-CFA.

Figura 8. Expressão relativa dos genes diferencialmente expressos em oócitos e células do cumulus dos grupos B-CFA e A-CFA



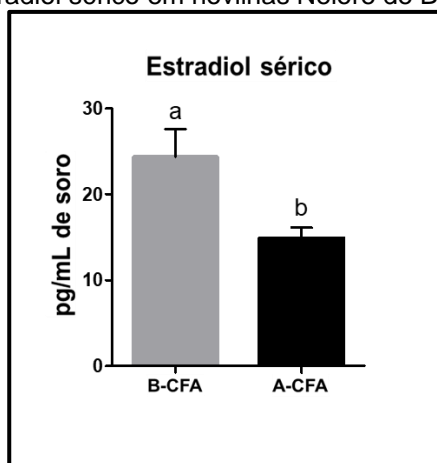
Fonte: Lima, M. A., 2019

Legenda: Os genes estão agrupados pelas funções de comunicação intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, divisão celular, recrutamento folicular, manutenção celular, esteroidogênese, estresse celular e apoptose, e resposta ao estresse celular. O grupo de B-CFA é representado pela barra cinza e o grupo de A-CFA, pela barra preta. Genes com expressões diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais estão indicadas por retângulos pretos ao redor de cada gráfico. As barras representam a média e as barras de erro representam o erro padrão da média.

5.3. ANIMAIS COM B-CFA APRESENTAM MAIORES NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL

Neste estudo, quantificamos as concentrações séricas de E2 para avaliar se existem diferenças no padrão hormonal entre os grupos de B-CFA e A-CFA. Encontramos maiores ($p \leq 0,05$) concentrações séricas de E2 no grupo de B-CFA em comparação ao grupo A-CFA ($24,4 \text{ pg/mL} \pm 10,2$ e $14,9 \text{ pg/mL} \pm 3,6$, respectivamente; (Figura 9).

Figura 9. Estradiol sérico em novilhas Nelore de B-CFA e A-CFA



Fonte: Lima, M. A., 2018

Legenda: Concentrações (pg/mL) de E2 sérico. Letras diferentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). O grupo de B-CFA é representado pela barra cinza e o grupo de A-CFA, pela barra preta. As barras de erro representam o erro padrão da média.

6. DISCUSSÃO

O número de folículos antrais ovarianos tem sido associado à performance reprodutiva em fêmeas *Bos indicus*. Apesar desta associação ser razoavelmente bem estabelecida, variações na fisiologia ovariana e nas características celulares e moleculares dos folículos de animais com diferentes CFA são amplamente desconhecidas. Sabendo que o desenvolvimento folicular é regulado por fatores locais e hormonais, no presente estudo, comparamos o padrão transcricional de diferentes

tipos celulares do ambiente folicular ovariano e os níveis hormonais de E2 sérico em novilhas Nelore de alta e baixa CFA. Nossos objetivos foram determinar se a CFA está correlacionada a diferenças nos padrões de transcritos em oócitos e em células do cumulus de genes importantes para o desenvolvimento folicular, bem como determinar se a CFA também tem relação com os níveis circulantes de E2.

A foliculogênese consiste no desenvolvimento de todos os tipos de células do folículo ovariano que, a seu modo, influenciam o ambiente folicular para proporcionar a preparação do oócito para futura maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (WEBB et al., 2016). Durante toda a foliculogênese, a comunicação intercelular no interior do folículo é extremamente importante para o desenvolvimento folicular e o crescimento de oócitos (EL-HAYEK; CLARKE, 2016). Genes diretamente relacionados à comunicação intercelular no ambiente folicular ovariano apresentaram diferentes níveis transcricionais entre os grupos de B-CFA e A-CFA. Dentre eles estão o *BMP15*, *HAS2*, *EGFR* e *NPR3* em oócitos e *EGFR*, *NPR2* e *NPR3* em CC.

O BMP15 é um fator secretado por oócitos que atua no próprio oócito e nas CC ao seu redor (KNIGHT; GLISTER, 2006). Nos nossos resultados apresentou expressão aumentada em oócitos do grupo de B-CFA. Estudos demonstram que os mRNAs *HAS2* e *EGFR*, elevam-se em resposta à presença de BMP15 (SU et al., 2010; YOSHINO et al., 2006). Tal afirmação está em concordância com nossos resultados, que mostram no grupo de B-CFA o *HAS2* aumentado nos oócitos e o *EGFR* aumentado tanto nos oócitos quanto nas células cumulus.

Além de influenciar os genes referenciados acima, o BMP15 estimula negativamente a expressão de receptores de FSH (*FSHR*) (OTSUKA et al., 2001). O FSH provavelmente esteja relacionado com a formação do antro folicular (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010; WANG et al., 2018). Deste modo, os altos níveis de *BMP15* nos oócitos de B-CFA talvez estejam relacionados aos baixos níveis de *FSHR* nas suas CC e, conseqüentemente, sejam um dos possíveis motivos da menor população folicular antral ovariana neste grupo de animais. Estudos complementares precisariam ser feitos para confirmar esta hipótese.

Outros genes envolvidos com a comunicação celular no ambiente folicular ovariano são o *NPR2* e *NPR3*, responsáveis pela via de controle meiótico (DE CESARO et al., 2015; ZHANG, 2017). No grupo de B-CFA dos nossos estudos, notamos que o *NPR2* está elevado em CC e o *NPR3* está aumentado nas CC e nos oócitos. Estes resultados demonstram que provavelmente a comunicação intercelular

seja diferente em animais com B-CFA e A-CFA e que talvez seja elevada nos folículos dos animais com B-CFA, principalmente pelo fato de genes responsivos a moléculas de comunicação, como o *HAS2*, *EGFR* e *FSHR* estarem com a expressão alterada, acompanhados do aumento de expressão de uma de suas moléculas reguladoras principais, o *BMP15*.

A comunicação intercelular é imperativa para o controle da parada meiótica (CLARKE, 2017). Nesta comunicação, peptídeos natriuréticos produzidos pelas células da granulosa, como o NPPC, ligam-se aos seus receptores nas CC e no oócito, como o NPR2 e o NPR3, que por sua vez ajudam a manter altos níveis do cAMP intraocitário, suprimindo a atividade de fatores promotores de maturação (ZHANG et al., 2010; CONTI et al., 2012). O controle adequado do bloqueio meiótico é importante durante o desenvolvimento folicular, pois enquanto presente, o núcleo oocitário encontra-se em uma conformação transcricionalmente permissiva, denominada vesícula germinativa (TAN et al., 2009) e, uma vez que a meiose é retomada, há a quebra da vesícula germinativa com a condensação completa da cromatina, impedindo a transcrição no oócito (ZHANG et al., 2010; CONTI et al., 2012). Além disto, a retomada da meiose também interrompe o fornecimento de RNAs e nutrientes para o oócito pelas CC, que deve ser dado durante o desenvolvimento folicular, para que ele seja capaz de sustentar o seu desenvolvimento até o estágio embrionário inicial (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; POHLER et al., 2012).

No grupo de B-CFA em nosso estudo, além do *NPR2* e *NPR3*, relacionados com a parada meiótica através da comunicação intercelular (CONTI et al., 2012), observamos uma regulação positiva de genes relacionados à quebra da vesícula germinativa, como o *RGS2* nas CC, conhecido por ser um marcador nas CC da fase de vesícula germinativa do oócito (DIECI et al., 2016); e de genes relacionados à modulação epigenética, como *DNMT3A*, *HDAC* e *PAF1* nas CC e o *H1FOO* nos oócitos (DING et al., 2009; KANEDA et al., 2010; HAYAKAWA et al., 2012; MA; SCHULTZ, 2013). Aparentemente o controle da parada meiótica, a fase de vesícula germinativa de oócitos e a modulação epigenética são diferencialmente modulados nas células foliculares de B-CFA e A-CFA.

Há evidências de que uma outra das funções influenciadas pelo *BMP15* seja a proliferação celular (OTSUKA et al., 2000). Genes de divisão celular, como o *CDK6* e o *PA2G4* estão regulados positivamente nas CC de B-CFA dos nossos estudos, as quais possuem oócitos com maiores níveis de *BMP15*. Um estudo de MACHADO et

al. (2017) relatou que há maior taxa de proliferação celular em folículos de Nelores de B-CFA, o que também pode ser um reflexo do aumento de expressão de genes de divisão constatados no mesmo grupo de animais dos nossos resultados.

Genes relacionados à esteroidogênese, como o *ARO* e *PTGS2* estão com a expressão diminuída nas CC de B-CFA. Como discutido acima, os transcritos de *FSHR* são inibidos na presença de *BMP15*, e uma de suas consequências é diminuir a expressão de *ARO* (OTSUKA et al., 2001). Este é um fato intrigante diante dos resultados de E2 elevado nas novilhas de B-CFA apresentados por este trabalho. Contudo, devemos atentar que durante a fase de formação do antro, as células da granulosa do folículo se diferenciam em CC e em células da granulosa murais, e que o modelo aceito sobre esta diferenciação defende um efeito contracorrente de gradiente oocitário de *BMP15* e fatores externos ovarianos (RONG LI et al., 2000; DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007). Deste modo, o menor padrão de *ARO* e *FSHR* nas CC do grupo de B-CFA, provavelmente em consequência do seu elevado *BMP15* oocitário, pode estar sendo mais importante nas CC do que nas células da granulosa murais, as quais são a principal fonte da produção de E2 folicular (STOCCO, 2008). Estudos adicionais são necessários para a confirmação desta suposição.

Relativo à função de recrutamento folicular nas vacas de B-CFA, além da observação do menor nível de *FSHR* exposto anteriormente, observamos um aumento dos transcritos *IGF1R* e *GSK3A* nas CC e de *IGFBP2* nos oócitos. Sabe-se que o sistema IGF participa no desenvolvimento folicular de modo estágio e dose dependente (SATRAPA et al., 2013). Os efeitos da alteração dos transcritos relativos a este sistema nos grupos estudados ainda são desconhecidos, contudo observa-se que provavelmente o controle deste sistema seja maior nos oócitos das vacas de B-CFA, uma vez que o *IGFBP2* é um regulador negativo deste sistema (SATRAPA et al., 2013).

Nós também observamos que os grupos de alta e baixa CFA apresentam genes diferentemente expressos relacionados à outras funções do desenvolvimento das células foliculares, tais quais a manutenção celular, estresse e resposta ao estresse. Dentro destas funções, há genes com expressão tanto aumentada quanto diminuída nos oócitos e CC dos grupos experimentais.

Sabe-se que a obtenção de energia é um ponto importante da manutenção celular. No contexto folicular, o oócito obtém energia principalmente pela entrega de

ATP e piruvato feito pelas CC adjacentes (GU et al., 2015). Diante disto, a alteração de *GAPDH* e *TFAM* nos oócitos e de *GAPDH*, *TFAM*, *PFKP*, *ATP5I* e *SREBF1* nas CC deve promover alterações energéticas no ambiente folicular ovariano, com efeitos ainda desconhecidos em animais com alta ou baixa CFA. Uma pesquisa de (SUGIURA et al., 2007) em camundongos demonstrou que o *Bmp15* é capaz de estimular a geração de energia pela glicólise através da ativação de *Pfkp*, uma enzima responsável pela via glicolítica. O aumento de *PFKP* nas CC, acompanhado do aumento de *BMP15* nos oócitos das novilhas de B-CFA encontra-se em consonância com estes dados.

Os genes relacionados ao estresse celular e apoptose *CASP9* e *STAT3* encontraram-se com expressão elevada nas CC de B-CFA. A apoptose nas CC, é muitas vezes utilizada como um marcador de má qualidade oocitária, contudo é importante que ela exista e que haja o seu controle adequado durante o desenvolvimento folicular (REGAN et al., 2018). Genes relacionados à apoptose também podem estar envolvidos em outras funções celulares. O *STAT3* é conhecido por atuar em funções como a expansão das CC durante a maturação, a proliferação celular e a regulação da expressão do microRNA mais abundante das CC de bovinos, o miR-21, cuja função ainda é desconhecida, mas acredita-se que atue na maturação do CCO, ovulação e apoptose (TSCHERNER et al., 2018). Assim como nossos resultados, (ROSA et al., 2018) também demonstrou o *STAT3* elevado em CC de Nelores com baixa CFA.

Genes de resposta ao estresse também apresentaram níveis aumentados ou diminuídos nos oócitos e CC dos grupos experimentais. Os transcritos de genes de proteção contra o estresse *PRDX3* e *XBP1* encontravam-se diminuídos nos oócitos, enquanto *XBP1* e *SOD1* estavam aumentados nas CC de baixa CFA. Sabe-se que a esteroidogênese gera radicais de oxigênio e um estresse do retículo endoplasmático (HATZIRODOS et al., 2014). Talvez as CC estejam produzindo maior quantidade dos transcritos observados para proteger o oócito de efeitos lesivos causados pela elevada produção de E2 observada no grupo de B-CFA. Na função de resposta ao estresse, observamos também que as proteínas de choque térmico ("*Heat Shock Proteins*", HSP), responsáveis pela proteção ao estresse térmico e conhecidas por serem marcadores de animais de maior termotolerância (COLLIER et al., 2008; HANSEN, 2015; SEJIAN et al., 2019), estavam aumentadas tanto em oócitos quanto em CC do grupo de B-CFA. Este pode ser um dado interessante a ser estudado

principalmente no contexto de animais de produção de leite, que possuem a reprodução ainda mais prejudicada pelas condições de estresse térmico.

Um trabalho recente também demonstrou que os padrões transcricionais de células foliculares ovarianas são diferentes entre vacas Nelore com alta e baixas CFA. Neste trabalho foram constatadas diferenças nos níveis transcricionais de CC e células da granulosa de genes relacionados à comunicação celular e desenvolvimento oocitário (ROSA et al., 2018). No entanto, o mesmo estudo também demonstrou que quando os oócitos das vacas de alta e baixa CFA são submetidos à PIVE, resultam em taxas de blastocisto similares. A similaridade das taxas de blastocisto na PIVE, apesar das diferenças transcricionais observadas, talvez ocorra em função dos efeitos destas variações transcricionais manifestarem-se no desenvolvimento após a transferência, dado que os embriões produzidos a partir de oócitos das vacas de B-CFA resultam em maiores taxas de gestação após a TE (WATANABE et al., 2017). Contribuindo com esta hipótese, um estudo demonstrou que um dos efeitos do BMP15 durante a maturação do CCO promove a estimulação de IFN-tau embrionário, uma molécula chave para a implantação embrionária e consequente melhoria nas taxas de gestação (VELÁSQUEZ et al., 2019).

Embora taxas mais altas de gestação sejam observadas após TE de vacas Nelore de baixa CFA (WATANABE et al., 2017), ainda é importante ponderar que o número de embriões - mas não a porcentagem - produzidos a partir de vacas de A-CFA durante a PIVE é consideravelmente maior do que o número obtido a partir de vacas de B-CFA (SANTOS et al., 2016b; WATANABE et al., 2017). O maior número de blastocistos produzidos a partir das vacas de alta CFA provavelmente seja um reflexo do maior número de CCOs recuperados pela aspiração folicular guiada por ultrassom encontradas em nosso estudo (Figura 6B).

Finalmente, neste trabalho mostramos que o E2 sérico difere entre os animais de A-CFA e de B-CFA. O E2 atua por meio da ativação da transcrição e da síntese de proteínas (HALL; COUSE; KORACH, 2001). Diante disto, espera-se que o padrão endócrino observado em nossos experimentos promova mudanças transcricionais entre os grupos experimentais. Um estudo *in vitro* indica que o E2 possui ação sinérgica com os fatores secretados pelo oócito BMP15 e GDF9, o que promove uma mediação da parada meiótica (BEKER-VAN WOUDEBERG et al., 2004). O padrão de resposta do sinergismo entre o E2 e o BMP15 prediz a ativação da transcrição de *NPR2* e *NPR3* (BEKER-VAN WOUDEBERG et al., 2004; LEE et al., 2013), genes

participantes da via de controle da parada meiótica durante a foliculogênese, como já discutido anteriormente. Estudos também demonstram que os hormônios esteróides podem interagir com o NPPC para modular a maturação nuclear e a comunicação entre o oócito e as CC (SOARES et al., 2017). Em nossas amostras, constatamos que o grupo de B-CFA possui maiores níveis de E2 e maiores transcritos de BMP15 e NPR3 nos oócitos e de NPR2 e NPR3 nas CC, coincidindo com os achados dos estudos citados anteriormente.

Pouco se sabe sobre a influência do E2 circulante no desenvolvimento folicular, porém muitos estudos sobre os efeitos dos níveis E2 intrafolicular são feitos, principalmente por volta do período periovulatório, para estudar a sua influência no oviduto e no útero (COMETTI et al., 2018; GONELLA-DIAZA et al., 2018; PERRY; PERRY, 2008; POHLER et al., 2012; SUGIURA et al., 2018). Curiosamente, encontramos um maior nível de E2 circulante no grupo de B-CFA.

Em nosso estudo, as vacas Nelore de B-CFA apresentam uma maior produção de E2 circulante. Considerando que o E2 tem sido apontado como um fator benéfico para as performances reprodutivas (POHLER et al., 2012; BINELLI et al., 2014) e que animais de baixa CFA apresentam maior taxa de gestação após IATF (MOROTTI et al. 2018; SANTOS et al., 2013) ou TE utilizando seus oócitos para a PIVE (WATANABE et al., 2017), vacas de B-CFA possivelmente recebem os benefícios de uma exposição maior ao E2, o que pode contribuir para as melhores taxas de gestação observadas nestes animais.

A partir dos nossos resultados em associação com os dados literários atuais sobre a influência da CFA nas performances reprodutivas de vacas Nelore, nossas principais especulações são que, embora as vacas Nelore com A-CFA tenham alguns indicativos de menor qualidade relacionada ao padrão transcricional nas células foliculares e menores taxas de gestação após TE, elas ainda são o foco principal para quem busca a produção de maior número de embriões pela PIVE, pois o padrão transcricional parece não ser suficiente para interferir negativamente neste processo. Enquanto isto, seria interessante haver mais estudos sobre a seleção de vacas Nelore de baixa CFA para IA ou como receptoras nos protocolos de TE, uma vez que está bem estabelecido que altos níveis de E2 estão associados a um melhor ambiente uterino.

7. CONCLUSÃO

Como conclusão deste estudo, nossos resultados demonstram que a CFA está associada a padrões moleculares diferenciais no ambiente folicular ovariano. Não é possível, por este trabalho estabelecer relações de causa-consequência entre os diferentes padrões transcricionais observados e a CFA. No entanto, tanto os padrões transcricionais de funções importantes para o desenvolvimento folicular quanto os níveis de E2 possivelmente estão associados aos diferentes parâmetros reprodutivos observados por trabalhos na literatura.

8. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 5, p. 438–464, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589950>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- AERTS, J.; BOLS, P. 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, 1 fev. 2010a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- AERTS, J.; BOLS, P. 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, 1 fev. 2010b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- ARAI, K.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S. Roles of inhibin and estradiol in the regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion during the estrous cycle of the rat. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 1, p. 127–33, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793067>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. H. **Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle**. **Anim. Reprod.**, v. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/53dd/b97176b7ccf5e700f7b4cdead390be89368e.pdf>>. Acesso em: 1 set. 2018.
- BATISTA, E.; MACEDO, G.; SALA, R.; ORTOLAN, M.; SÁ FILHO, M.; DEL VALLE, T.; JESUS, E.; LOPES, R.; RENNÓ, F.; BARUSELLI, P. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448–452, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24689827>>. Acesso em: 13 out. 2017.
- BEKER-VAN WOUDEBERG, A. R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1465–1474, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724136>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- BENNABI, I.; TERRET, M.-E.; VERLHAC, M.-H. Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. **The Journal of cell biology**, v. 215, n. 5, p. 611–619, 5 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27879467>>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V. V.; SPONCHIADO, M.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M. L.; FRANÇA, M. R.; D'ALEXANDRI, F. L.; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. **Anim. Reprod**, v. 11, n. 3, p. 246–253, 2014. Disponível em: <<http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v11n3/pag246-253%28AR683%29.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, abr. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X01004812>>. Acesso em: 21 jun. 2018.
- BURATINI, J.; CAROLINE, A.; SOARES, S.; BARROS, R. G. Follicular environment and oocyte maturation: roles of local peptides and steroids. 2017. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p601-606\(AR1003\)AETE.pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p601-606(AR1003)AETE.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; 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 Concentrations1. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54–62, 1 jul. 2005a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.036277>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; 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 Concentrations1. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54–62, 1 jul. 2005b. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.036277>>. Acesso em: 17 jan. 2019.
- CAMPBELL, B. K.; DOBSON, H.; BAIRD, D. T.; SCARAMUZZI, R. J. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. **Journal of reproduction and fertility**, v. 117, n. 2, p. 355–67, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690204>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- CHEESEMAN, L. P.; BOULANGER, J.; BOND, L. M.; SCHUH, M. Two pathways regulate cortical granule translocation to prevent polyspermy in mouse oocytes. **Nature Communications**, v. 7, p. 13726, 19 dez. 2016.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms13726>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

CLARKE, H. Control of Mammalian Oocyte Development by Interactions with the Maternal Follicular Environment. In: KLOC M. (Ed.). **Oocytes**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 17–41.

COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445–454, 1 fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208713869?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

COMETTI, B. P. S.; DUBEY, R. K.; IMTHURN, B.; ROSSELLI, M. Natural and environmental oestrogens induce TGFB1 synthesis in oviduct cells. **Reproduction**, v. 155, n. 3, p. 233–244, mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29254988>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

CONTI, M.; HSIEH, M.; MUSA ZAMAH, A.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, 5 jun. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720711006551>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; MIGNINI RENZINI, M.; GUGLIELMO, M. C.; BRAMBILLASCA, F.; TURCHI, D.; NOVARA, P. V.; FADINI, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 4, p. 427–454, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/humupd/article/21/4/427/683343/Oocyte-maturation-gametesomatic-cells-interactions>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

DA SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G. S.; MORA, J. M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T. A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 23, p. 3890–3900, 1 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001500>>. Acesso em: 13 out. 2018.

DEKEL, N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 541, p. 211–6, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848437>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

DIAZ, F. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of cell science**, v. 120, n. Pt 8, p. 1330–40, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389684>>. Acesso em: 19 set. 2018.

DIECI, C.; LODDE, V.; LABREQUE, R.; DUFORT, I.; TESSARO, I.; SIRARD, M.-A.; LUCIANO, A. M. Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve *in-vitro* bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 882–897, 24 ago. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gaw055>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

DING, L.; PASZKOWSKI-ROGACZ, M.; NITZSCHE, A.; SLABICKI, M. M.; HENINGER, A.-K.; VRIES, I. de; KITTLER, R.; JUNQUEIRA, M.; SHEVCHENKO, A.; SCHULZ, H.; HUBNER, N.; DOSS, M. X.; SACHINIDIS, A.; HESCHELER, J.; IACONE, R.; ANASTASSIADIS, K.; STEWART, A. F.; PISABARRO, M. T.; CALDARELLI, A.; POSER, I.; THEIS, M.; BUCHHOLZ, F. A Genome-Scale RNAi Screen for Oct4 Modulators Defines a Role of the Paf1 Complex for Embryonic Stem Cell Identity. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 403–415, 8 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345177>>. Acesso em: 15 out. 2018.

DISKIN, M.; MORRIS, D. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 260–267, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638133>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

DUCIBELLA, T.; DUFFY, P.; REPRODUCTION, J. B.-B. of; 1994, U. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 467–473, 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/50/3/467/2762492>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

DURLINGER, A. L. L.; GRUIJTERS, M. J. G.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T. R.; MATZUK, M. M.; ROSE, U. M.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T. J.; GROOTEGOED, J. A.; THEMEN, A. P. N. Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4891–4899, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606457>>. Acesso em: 13 out. 2018.

EL-HAYEK, S.; CLARKE, H. J. Control of Oocyte Growth and Development by Intercellular Communication Within the Follicular Niche. In: PIPREK, R. P. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development**. [s.l.] Springer, Cham, 2016. p. 191–224.

EVANS, A.; MOSSA, F.; WALSH, S.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. J.; SMITH, G.; 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, ago. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E.; DYSON, M.; BAILLIE, A. J.; ROBERTSON, D. M.; ETHIER, J.-F. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 180, n. 1–2, p. 139–144, 30 jul. 2001. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701005214>>. Acesso em: 13 out. 2018.

GARVERICK, H. A.; JUENGL, J. L.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; BURKHART, M. N.; PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; MCNATTY, K. P. Development of the ovary and ontogeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) α and β during early fetal life in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1–2, p. 24–33, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501990>>. Acesso em: 13 out. 2018.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; 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, 29 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926195>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

GONELLA-DIAZA, A. M.; SILVEIRA MESQUITA, F.; LOPES, E.; RIBEIRO DA SILVA, K.; COGLIATI, B.; DE FRANCISCO STREFEZZI, R.; BINELLI, M. Sex steroids drive the remodeling of oviductal extracellular matrix in cattle. **Biology of Reproduction**, 5 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659700>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

GREENFIELD, A. **Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development**. [s.l.: s.n.]v. 58

GU, L.; LIU, H.; GU, X.; BOOTS, C.; MOLEY, K. H.; WANG, Q. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 2, p. 251–271, 4 jan. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1739-4>>. Acesso em: 4 jun. 2019.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 5 out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459850>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

HANSEN, P. J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 22–30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/RD14311>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

HATZIRODOS, N.; IRVING-RODGERS, H. F.; HUMMITZSCH, K.; HARLAND, M. L.; MORRIS, S. E.; RODGERS, R. J. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 24, 14 jan. 2014. Disponível em: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-24>>. Acesso em: 31 maio. 2019.

HAYAKAWA, K.; OHGANE, J.; TANAKA, S.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. **Epigenetics**, v. 7, n. 9, p. 1029–1036, 7 set. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/epi.21492>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

HEN, G.; SELA-DONENFELD, D. “A narrow bridge home”: The dorsal mesentery in primordial germ cell migration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 29 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1084952117305396>>. Acesso em: 10 set. 2018.

HSIEH, M.; ZAMAH, A.; CONTI, M. Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in the Follicular Fluid: Role in Oocyte Development and Maturation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 01, p. 052–061, 5 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197805>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

HUANG, Z.; WELLS, D. Molecular aspects of follicular development. In: DONNEZ, J.; SAMUEL, K. (Ed.). **Principles and Practice of Fertility Preservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 114–128.

IRELAND, J. L. H. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H. J.; 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. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 1, 2011. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD10226>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219–1225, 1 dez. 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768912>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219–1225, 1 dez. 2008b. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.108.071670>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

IRELAND, J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. 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, 21 mar. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article->

lookup/doi/10.1093/humrep/dem071>. Acesso em: 14 set. 2018.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU, X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; 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 Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1272–1281, 1 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211804>>. Acesso em: 13 out. 2017.

JORGENSEN, J. S. Defining the neighborhoods that escort the oocyte through its early life events and into a functional follicle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 12, p. 960–976, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24105719>>. Acesso em: 13 out. 2018.

KANEDA, M.; HIRASAWA, R.; CHIBA, H.; OKANO, M.; LI, E.; SASAKI, H. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with *Zp3*-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. **Genes to Cells**, v. 15, n. 3, p. 169–179, 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2443.2009.01374.x>>. Acesso em: 15 out. 2018.

KANG, M.-K.; HAN, S.-J. Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. **BMB Reports**, v. 44, n. 3, p. 147–157, 31 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429291>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

KIM, B.; ZHANG, X.; KAN, R.; COHEN, R.; ... C. M.-D.; 2014, U. The role of MATER in endoplasmic reticulum distribution and calcium homeostasis in mouse oocytes. **Elsevier**, v. 386, n. 2, p. 331–339, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160613006878>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

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

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Focus on TGF-b Signalling TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191–206, 2006b. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.561.4375&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

LAWSON, K. A.; HAGE, W. J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. **Ciba Foundation symposium**, v. 182, p. 68–84; discussion 84-91, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7835158>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

LEE, K.-B.; ZHANG, M.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; ULIASZ, T.; JAFFE, L. A.; EPPIG, J. J. Hormonal Coordination of Natriuretic Peptide Type C and Natriuretic Peptide Receptor 3 Expression in Mouse Granulosa Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 2, p. 42, 1 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255339>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

LOOPER, M. L.; VIZCARRA, J. A.; WETTEMANN, R. P.; MALAYER, J. R.; BRADEN, T. D.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. **Journal of animal science**, v. 81, n. 1, p. 269–78, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597398>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

MA, P.; SCHULTZ, R. M. Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Regulates Chromosome Segregation and Kinetochores Function via H4K16 Deacetylation during Oocyte Maturation in Mouse. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003377, 14 mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003377>>. Acesso em: 15 out. 2018.

MACHADO, F. Z.; BERGAMO, L. Z.; BIZARRO-SILVA, C.; MOROTTI, F.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. **Cell proliferation in ovarian follicles from Bos taurus indicus females with different antral follicle count***Anim. Reprod.*, v. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://sheepembryo.com.br/wp-content/uploads/2018/04/Zandonadi_AR2017_Cell-proliferation-in-ovarian-follicles-from-Bos-taurus-indicus-females-with-different-antral-follicle-count-.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2018.

MAHROUS, E.; YANG, Q.; CLARKE, H. J. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. **REPRODUCTION**, v. 144, n. 2, p. 177–185, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641769>>. Acesso em: 13 out. 2018.

MAREI, W. F.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. Role of PTGS2-generated PGE 2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 3, p. 388–400, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.005>>.

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, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489910>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

MCNATTY, K. P.; READER, K.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. **Society of Reproduction and Fertility supplement**,

- v. 64, p. 55–68, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17491140>>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- MENCHACA, A.; CUADRO, F.; DOS SANTOS-NETO, P. C.; BOSOLASCO, D.; BARRERA, N.; DE BRUN, V.; CRISPO, M. Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 321–328, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S037843201830294X>>. Acesso em: 31 ago. 2018.
- MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IRELAND, and J. J. Identification of Potential Intrafollicular Factors Involved in Selection of Dominant Follicles in Heifers1. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 811–819, 1 set. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod63.3.811>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- MORA, J. M.; FENWICK, M. A.; CASTLE, L.; BATHUN, M.; RYDER, T. A.; MOBBERLEY, M.; CARZANIGA, R.; FRANKS, S.; HARDY, K. Characterization and Significance of Adhesion and Junction-Related Proteins in Mouse Ovarian Follicles1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 5, p. 153, 1–14, 1 maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321830>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- MOROTTI, F.; FONSECA ZANGIROLAMO, A.; COVRE DA SILVA, N.; BIZARRO DA SILVA, C.; OLIVEIRA ROSA, C.; MARCONDES SENEDA, M.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; SILVA, C. B.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M.; FONSECA ZANGIROLAMO, A.; COVRE DA SILVA, N.; BIZARRO DA SILVA, C.; OLIVEIRA ROSA, C.; MARCONDES SENEDA, M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 514–520, 2017. Disponível em: <<http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p514-520> (AR994) SBTE.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; RAMOS CERQUEIRA, P. H.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 170–177, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S037843201730444X?via=ihub>>. Acesso em: 30 jul. 2018.
- 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. 2016. Disponível em: <http://sheepembryo.com.br/wp-content/uploads/2018/04/Morotti_Therio2017_Correlation-between-phenotype-genotype-and-antral-follicle-population-in-beef-heifers.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- MOSSA, F.; KENNY, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SMITH, G. W.; BERRY, D.; BUTLER, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Undernutrition of Heifers During the First Trimester of Pregnancy Diminishes Size of the Ovarian Reserve in Female Offspring. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. Suppl_1, p. 135–135, 1 jul. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/2955028/Undernutrition>>. Acesso em: 13 out. 2017.
- 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 of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2355–2361, 1 maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541464>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- NAGAI, K.; YANAGAWA, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral follicles. **Biomedical Research**, v. 37, n. 1, p. 63–71, 1 fev. 2016. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/37/1/37_63/_article>. Acesso em: 26 set. 2018.
- NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 3, p. 1018–24, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193416>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Bone Morphogenetic Protein-4 Acts as an Ovarian Follicle Survival Factor and Promotes Primordial Follicle Development. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1265–1272, 28 maio 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.103.018671>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 214, n. 1–2, p. 19–25, 12 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062541>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- NOSEIR, W. M. B. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 1, p. 50, 21 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848893>>. Acesso em: 12 jun. 2018.
- OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **The Journal of biological chemistry**,

v. 276, n. 14, p. 11387–92, 6 abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154695>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523–8, 15 dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998422>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.-L. C.; CONTI, M. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682–684, 30 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726596>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

PEPLING, M. E. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development. **Genesis**, v. 44, p. 622–632, 2006.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 333–338, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980539>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

POHLER, K. G.; GEARY, T. W.; ATKINS, J. A.; PERRY, G. A.; JINKS, E. M.; SMITH, M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 649–664, 18 set. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-012-1386-8>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

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, 1 jun. 2011. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0093691X11000057?via=ihub>>. Acesso em: 6 ago. 2018.

REGAN, S. L. P.; KNIGHT, P. G.; YOVICH, J. L.; LEUNG, Y.; ARFUSO, F.; DHARMARAJAN, A. Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle—A Changing View. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 61, 2 mar. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00061/full>>. Acesso em: 29 maio. 2019.

REIZEL, Y.; ELBAZ, J.; DEKEL, N. Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 2, p. 402–11, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009084>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

RICO, C.; FABRE, S.; MEDIGUE, C.; CLEMENTE, N. d.; CLEMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZE, J.-L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; REMY, B.; BECKERS, J.-F.; MONNIAUX, D. Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 1, p. 50–59, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.108.072157>>. Acesso em: 14 set. 2018.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1021–1029, 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.109.082941>>. Acesso em: 11 out. 2018.

RONG LI; ROBERT J. NORMAN; DAVID T. ARMSTRONG; ROBERT B. GILCHRIST. Oocyte-Secreted Factor(s) Determine Functional Differences Between Bovine Mural Granulosa Cells and Cumulus Cells. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, n. 63, p. 839–845, 2000. Disponível em: <https://watermark.silverchair.com/biolreprod0839.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kxhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAIawggJMBgkqhkiG9w0BBwagggI9MIICOQIBADCCAjIGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQM EAS4wEQQMSR5tYfAKuybelmqhAgEQgIIcAxZcCC4znD5qKIRHyW1QaeglTmWa2SG_6c0qK29c>. Acesso em: 19 set. 2018.

ROSA, C.; MARINHO, L.; DA ROSA, P.; DE CESARO, M.; LUNARDELLI, P.; SILVA-SANTOS, K.; BASSO, A.; BORDIGNON, V.; SENEDA, 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**, 16 maio 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.13189>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

RUSSELL, D.; SALUSTRI, A. Extracellular Matrix of the Cumulus-Oocyte Complex. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 24, n. 4, p. 217–227, set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16944419>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis ☆. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012. Disponível em: <https://ac-els-cdn.ez67.periodicos.capes.gov.br/S0925443912001214/1-s2.0-S0925443912001214-main.pdf?_tid=680407c9-c3cc-4a86-af8f-6d955e62e4dc&acdnat=1536584479_cc7c6c6c431373b821f37248dd978433>. Acesso em: 10 set. 2018.

SANTOS, G. M. G. dos; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; DE

- MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M.; MARTINS GOMES DOS SANTOS, G.; CRISTINA SILVA-SANTOS, K.; MOROTTI, F.; VALENTE SANCHES, B.; RICARDO RIGO BARREIROS, T.; LUCAS ZITO DE MORAES, F.; BLASCHI, W.; MARCONDES SENEDA, 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, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.024>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; MOROTTI, F.; SILVA, C. B.; MORAES, F. L. Z.; GIUDICISSI, D. P. L.; SENEDA, M. M. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Abstracts. Anim. Reprod**, v. 10, n. 3, p. 451, 2013. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p429-491\(A061-A123\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p429-491(A061-A123).pdf)>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- SATRAPA, R. A.; CASTILHO, A. S.; RAZZA, E. M.; PEGORER, M. F.; PUELKER, R.; BARROS, C. M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3–4, p. 155–158, 1 maio 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432013000882#bib0200>>. Acesso em: 26 maio. 2019.
- SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 444–467, 2011. Disponível em: <www.publish.csiro.au/journals/rfd>. Acesso em: 1 set. 2018.
- SEJIAN, V.; BAGATH, M.; KRISHNAN, G.; RASHAMOL, V. P.; PRAGNA, P.; DEVARAJ, C.; BHATTA, R. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. **Small Ruminant Research**, v. 173, p. 42–53, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448819300367#bib0350>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- 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, 1 abr. 2014a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12255>>. Acesso em: 30 ago. 2018.
- SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; SANTOS, J. T.; OLIVEIRA, E. R.; MACHADO, F. Z.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 119–125, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.0160378-4320>>. Acesso em: 1 set. 2018.
- SILVA-SANTOS, K.; SANTOS, G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.; MARCANTONIO, T.; URBANO, M.; OLIVEIRA, R.; LIMA, D.; SENEDA, 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, abr. 2014c. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12255>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- SILVA-SANTOS, K.; SILOTO, L.; SANTOS, G.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T.; SENEDA, M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 48–51, fev. 2014d. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12222>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 5, p. 461–471, 2005.
- SMALLWOOD, S. A.; TOMIZAWA, S.; KRUEGER, F.; RUF, N.; CARLI, N.; SEGONDS-PICHON, A.; SATO, S.; HATA, K.; ANDREWS, S. R.; KELSEY, G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. **Nature Genetics**, v. 43, n. 8, p. 811–814, 26 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.864>>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- SOARES, A. C. S.; LODDE, V.; BARROS, R. G.; PRICE, C. A.; LUCIANO, A. M.; BURATINI, J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in vitro-produced embryos in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 11, p. 2217–2224, out. 2017. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD16320>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- STOCCO, C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids**, v. 73, n. 5, p. 473–487, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321551>>. Acesso em: 25 maio. 2019.
- SUGIURA, K.; SU, Y.-Q.; DIAZ, F. J.; PANGAS, S. A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; MATZUK, M. M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 14, p. 2593–603, 15 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553902>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

- SUGIURA, T.; AKIYOSHI, S.; INOUE, F.; YANAGAWA, Y.; MORIYOSHI, M.; TAJIMA, M.; KATAGIRI, S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 2, p. 135–143, 13 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29398684>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- SUSOR, A.; JANSOVA, D.; CERNA, R.; DANYLEVSKA, A.; ANGER, M.; TORALOVA, T.; MALIK, R.; SUPOLIKOVA, J.; COOK, M. S.; OH, J. S.; KUBELKA, M. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR–eIF4F pathway. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6078, 28 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncomms7078>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- TAN, J.-H.; WANG, H.-L.; SUN, X.-S.; LIU, Y.; SUI, H.-S.; ZHANG, J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019837>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- TESSARO, I.; LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; LODDE, V.; CORBANI, D.; MODINA, S. C. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2389–2396, 1 ago. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/89/8/2389-2396/4764445>>. Acesso em: 14 set. 2018.
- TOMIZAWA, S.-I.; NOWACKA-WOSZUK, J.; KELSEY, G. DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10-11–12, p. 867–875, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23417409>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- TSCHERNER, A.; BROWN, A. C.; STALKER, L.; KAO, J.; DUFORT, I.; SIRARD, M.-A.; LAMARRE, J. STAT3 signaling stimulates miR-21 expression in bovine cumulus cells during in vitro oocyte maturation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11527, 1 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-29874-w>>. Acesso em: 30 maio. 2019.
- TURZILLO, A. M.; NOLAN, T. E.; NETT, T. M. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Gene Expression in Sheep: Interaction of GnRH and Estradiol¹. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4890–4894, dez. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832425>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- UZBEKOVA, S.; SALHAB, M.; PERREAU, C.; MERMILLOD, P.; DUPONT, J. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during in vitro maturation. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p. 235–246, 2009. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/REP-09-0136>>.
- VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 797–813, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933103>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- VELÁSQUEZ, A.; MELLISHO, E.; CASTRO, F. O.; RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, L. Effect of BMP15 and/or AMH during in vitro maturation of oocytes from involuntarily culled dairy cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 2, p. 209–223, 27 fev. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.23096>>. Acesso em: 26 maio. 2019.
- WALSH, S. W.; MOSSA, F.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; TEMPELMAN, R. J.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; 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, jul. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003567>>. Acesso em: 13 set. 2018.
- WANG, D.; DI, X.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, D.; HOU, Y.; HU, J.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; SUN, M.; MENG, X.; SUN, B.; JIANG, C.; MA, T.; SU, W. Increased Formation of Follicular Antrum in Aquaporin-8-Deficient Mice Is Due to Defective Proliferation and Migration, and Not Steroidogenesis of Granulosa Cells. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1193, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30190683>>. Acesso em: 11 out. 2018.
- WANG, L. M.; WEN, J. X.; YUAN, J. L.; CANG, M.; LIU, D. J. Knockdown of IGF-IR by siRNA injection during bovine preimplantation embryonic development. **Cytotechnology**, v. 64, n. 2, p. 165–172, 22 mar. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10616-011-9402-5>>. Acesso em: 19 jun. 2018.
- WATANABE, Y. F.; HENRYLI DE SOUZA, A.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; OLIVEIRA, E.; BATISTA, S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; FÁBIO, M.; NOGUEIRA, G.; BENTO, J.; FERRAZ, S.; 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. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p635-644\(AR1008\)SBTE.pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p635-644(AR1008)SBTE.pdf)>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- WEBB, R.; BURATINI, J.; HERNANDEZ-MEDRANO, J. H.; GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K. Follicle development and selection: past, present and future. **Anim. Reprod**, v. 13, n. 3, p. 234–249, 2016. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p234-249\(AR883\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p234-249(AR883).pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2018.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J.-G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local

interactions and nutritional influences,. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. suppl_13, p. E63–E74, 1 jan. 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/82/suppl_13/E63/4807405>. Acesso em: 13 out. 2018.

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 1. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 78, p. 1153–1161, 2008. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org>>. Acesso em: 10 set. 2018.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 399–409, 1 jul. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gap031>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

ZHANG, M.; SU, Y.-Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, 15 out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947764>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A – Níveis de expressão relativa em oócitos e células do cumulus de novilhas de B-CFA e A-CFA. A média é representada pelo símbolo \bar{X} , o desvio padrão por “DP” e o número de amostras com o valor de expressão detectado por “N”. Valores de expressão não detectados são representados por “n.d.” e valores de P não encontrados por “-”.

Gene	OÓCITO							CÉLULAS DO CUMULUS						
	B-CFA			A-CFA				valor de p	B-CFA			A-CFA		
	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N			\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N
<i>AGTR1</i>	n.d.	n.d.	0	0,001715	0,000465	2	-	0,000537	n.d.	1	0,00148	0,000386	3	-
<i>AGTR2</i>	n.d.	n.d.	0	0,00062	n.d.	1	-	0,017815	0,03148	7	0,003732	0,004527	7	0,264103
<i>AREG</i>	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>ARO</i>	0,002581	0,003155	4	0,001449	0,001052	3	0,583874	0,003675	0,002225	7	0,008509	0,003416	8	0,007082
<i>ATF4</i>	0,046834	0,054514	7	0,008532	0,009002	6	0,118966	0,000705	n.d.	1	0,008984	0,007248	4	-
<i>ATP5L</i>	0,478302	0,228367	10	0,46557	0,143312	9	0,887557	7,324333	6,968374	7	0,837818	1,077322	8	0,02154
<i>AUH</i>	n.d.	n.d.	0	0,006037	0,002997	3	-	0,00446	0,006995	3	0,000882	n.d.	1	-
<i>BAX</i>	0,051564	0,025506	10	0,0523	0,0251	9	0,95029	0,00775	0,006027	6	0,008739	0,002476	8	0,679609
<i>BCL2</i>	0,006861	0,005638	9	0,005874	0,007543	7	0,768445	0,00809	0,011059	5	0,00103	0,000595	2	0,432698
<i>BID</i>	0,061528	0,047058	10	0,037924	0,018148	9	0,176557	2,654306	4,670472	7	0,168372	0,418319	8	0,155776
<i>BMP15</i>	3,332234	3,296729	10	0,780952	0,724948	9	0,036749	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>CASP3</i>	0,008846	0,010361	9	0,001665	0,002288	9	0,059297	1,68E-05	1,83E-05	2	0,001198	0,000735	6	0,074632
<i>CASP9</i>	0,073514	0,039056	10	0,075097	0,042115	9	0,933232	0,506023	0,555318	7	0,064279	0,10879	8	0,045366
<i>CAT</i>	0,383163	0,19209	10	0,475475	0,190133	9	0,307993	4,301434	6,289798	7	0,321453	0,629586	8	0,09689
<i>CCND2</i>	0,082753	0,068321	10	0,05706	0,044245	7	0,397529	43,31624	54,222	7	2,195506	3,675061	8	0,05085
<i>CDCA8</i>	2,984914	2,321671	10	1,273038	0,992243	9	0,056576	0,001184	0,001087	3	0,003857	0,002418	6	0,118366
<i>CDK6</i>	0,007027	0,004237	10	0,010242	0,005506	9	0,169397	0,193606	0,181205	7	0,030096	0,030958	8	0,025423
<i>DDIT3</i>	0,477981	0,188969	10	0,359408	0,030626	9	0,080965	0,033022	0,030148	7	0,035487	0,033698	7	0,887711
<i>DICER1</i>	0,759375	0,584487	10	1,143629	0,622556	9	0,183184	6,285655	8,661845	7	0,280841	0,654203	8	0,071135
<i>DNMT1</i>	0,72693	0,459723	10	0,424935	0,09237	9	0,070384	0,012919	0,009474	7	0,009193	0,005779	8	0,367268
<i>DNMT3A</i>	0,344986	0,172534	10	0,53049	0,216293	9	0,053246	2,862023	2,901347	7	0,143452	0,210251	8	0,019754
<i>DNMT3B</i>	0,689605	0,469587	10	0,639257	0,26288	9	0,780122	0,007469	0,009279	5	0,001054	0,000403	3	0,29056

Gene	OÓCITO							CÉLULAS DO CUMULUS						
	B-CFA			A-CFA				B-CFA			A-CFA			
	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de p	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de P
<i>EGFR</i>	0,121764	0,05283	10	0,060965	0,031344	9	0,00798	0,642866	0,502972	7	0,154167	0,092415	8	0,017832
<i>FOXO3</i>	0,223804	0,17642	10	0,160485	0,064763	9	0,324547	0,003954	0,003527	6	0,004906	0,001929	7	0,549708
<i>FSHR</i>	0,003659	0,002559	4	0,003326	n.d.	1	-	0,004811	0,006191	5	0,018739	0,012739	7	0,048955
<i>G6PD</i>	0,147443	0,054046	10	0,155406	0,050178	9	0,744247	0,047607	0,02278	7	0,057373	0,027199	8	0,468273
<i>GADD45A</i>	0,084898	0,08704	10	0,022953	0,02578	9	0,056078	0,007994	0,01458	4	0,092722	0,106003	6	0,15797
<i>GAPDH</i>	2,053895	0,995496	10	0,943734	0,498917	9	0,007784	0,69233	1,077153	7	2,586843	1,972033	8	0,041833
<i>GDF9</i>	1,299652	0,881581	10	0,915083	0,448489	9	0,255601	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>GFPT2</i>	0,2485	0,150194	10	0,254789	0,132953	9	0,92452	7,590127	9,211513	7	0,098242	0,198536	7	0,052518
<i>GLRX2</i>	0,039939	0,046052	10	0,064122	0,046643	9	0,271718	29,39652	61,85018	7	0,065388	0,071278	7	0,233478
<i>GPAM</i>	0,060985	0,027573	10	0,086084	0,057715	9	0,235189	0,211869	0,251444	7	0,020248	0,037619	8	0,051925
<i>GPX1</i>	0,240108	0,179669	10	0,167276	0,173245	9	0,382141	0,941696	0,358159	7	1,233529	0,642049	8	0,306956
<i>GPX4</i>	0,076078	0,085344	9	0,012108	0,011085	8	0,053373	0,001346	0,001918	3	0,008592	0,006679	7	0,111113
<i>GREM1</i>	0,003317	0,003303	4	0,002461	0,003441	3	0,752213	3,8E-06	n.d.	1	0,000374	0,000328	3	-
<i>GSK3A</i>	1,595261	0,652611	10	1,278303	0,232033	9	0,186244	0,399928	0,294865	7	0,129275	0,105707	8	0,03008
<i>H1FOO</i>	2,261571	0,768972	10	1,09008	0,37533	9	0,000685	0,000424	n.d.	1	0,000321	0,000396	2	-
<i>HAS2</i>	0,131749	0,130317	10	0,025654	0,031328	9	0,029584	0,000565	0,000778	2	0,008518	0,008779	6	0,270228
<i>HDAC2</i>	0,088695	0,024782	10	0,079815	0,018933	9	0,396556	0,049193	0,021206	7	0,024874	0,008846	8	0,010769
<i>HIF1A</i>	0,222321	0,214296	10	0,076603	0,096695	9	0,078564	0,016064	0,022964	3	0,373624	0,323524	7	0,101819
<i>HSF1</i>	0,546928	0,513711	10	0,133503	0,12235	9	0,031186	0,002775	0,003716	3	0,015052	0,011437	7	0,115499
<i>HSP90AA1</i>	7,668545	3,768651	10	7,712466	1,657448	9	0,974686	6,869727	5,208091	7	2,663778	1,298507	8	0,044999
<i>HSPA1A</i>	0,082636	0,142056	10	0,004347	0,006258	8	0,141184	0,003226	0,004211	2	0,109496	0,151283	6	0,382378
<i>HSPA5</i>	0,332608	0,23175	10	0,251789	0,147545	9	0,383605	2,630734	0,876845	7	1,41772	0,736827	8	0,012093
<i>HSPD1</i>	1,328743	0,939841	10	2,144769	0,97885	9	0,081305	168,6862	173,705	7	3,902221	7,283626	8	0,018359
<i>IGF1R</i>	0,21617	0,12967	10	0,200471	0,105818	9	0,777569	1,373655	1,31414	7	0,153272	0,063359	8	0,020489
<i>IGF2</i>	0,009699	0,013919	5	n.d.	n.d.	0	-	0,895728	1,729613	7	0,012536	0,010595	5	0,286536
<i>IGFBP2</i>	0,322245	0,255177	10	0,111373	0,043762	9	0,025926	0,029813	0,025896	6	0,009842	0,011683	6	0,115808
<i>IGFBP4</i>	0,003552	0,003579	2	n.d.	n.d.	0	-	0,001782	0,002139	2	0,002063	0,001617	3	0,875629
<i>KEAP1</i>	0,068139	0,039788	10	0,077833	0,074308	9	0,723343	2,204291	2,924409	7	0,131019	0,277364	8	0,066145

Gene	OÓCITO							CÉLULAS DO CUMULUS						
	B-CFA			A-CFA				B-CFA			A-CFA			
	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de p	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de P
<i>LHCGR</i>	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-	0,010588	0,014287	2	0,001022	n.d.	1	-
<i>MAPK1</i>	1,878637	0,617815	10	1,676173	0,631534	9	0,489861	0,094676	0,054595	7	0,093732	0,027395	8	0,966182
<i>MTIF3</i>	0,016232	0,016165	9	0,003798	0,005608	7	0,073626	9,34E-05	0,000122	2	0,000793	0,000696	4	0,253354
<i>NANOG</i>	0,000824	n.d.	1	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>NFE2L2</i>	0,074997	0,041318	9	0,073797	0,064191	7	0,964349	0,216314	0,285271	7	0,027829	0,022947	7	0,106969
<i>NFKB2</i>	0,021311	0,021051	9	0,00958	0,008483	8	0,162366	0,000647	0,000622	5	0,003085	0,001837	6	0,020242
<i>NOS2</i>	3,265311	4,527397	10	3,328944	2,134203	9	0,969801	85,22505	150,5027	7	4,176848	9,703541	8	0,150498
<i>NOS3</i>	0,084227	0,041055	10	0,073223	0,043007	9	0,575864	0,078783	0,132606	4	0,011213	0,010476	3	0,429331
<i>NPPA</i>	0,000623	n.d.	1	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>NPPB</i>	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
<i>NPPC</i>	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	0,00374	n.d.	1	-
<i>NPR1</i>	0,001716	0,001133	5	0,001208	0,001034	4	0,510416	0,000234	0,000145	5	0,000269	0,000129	2	0,783348
<i>NPR2</i>	0,010527	0,009936	9	0,008501	0,007123	8	0,640119	0,035201	0,027047	7	0,006803	0,00628	8	0,012493
<i>NPR3</i>	0,006161	0,000402	3	0,00366	0,000671	2	0,012481	0,08445	0,07117	6	0,013187	0,004459	7	0,022059
<i>NR1H3</i>	0,000567	0,000466	7	0,000144	n.d.	1	-	1,46E-05	n.d.	1	0,000156	0,000119	3	-
<i>OOSP1</i>	5,687154	2,135872	10	5,204682	1,681635	9	0,594484	9,86E-05	n.d.	1	0,000541	n.d.	1	-
<i>PA2G4</i>	1,275523	0,896668	10	2,119116	1,099736	9	0,08317	77,08549	97,15053	7	2,605763	5,918289	8	0,048617
<i>PAF1</i>	4,02573	3,00429	10	4,706298	2,58121	9	0,60532	14,12647	14,00996	7	1,090667	2,393904	8	0,021907
<i>PDE5A</i>	0,128145	0,051264	10	0,164021	0,055999	9	0,162997	0,002012	0,001234	5	0,005783	0,004951	7	0,130907
<i>PFKP</i>	0,049368	0,03875	10	0,048596	0,03594	9	0,964723	2,5602	2,677715	7	0,368257	0,247066	8	0,037481
<i>PGK1</i>	0,064106	0,026011	10	0,080568	0,037576	9	0,278123	22,78395	33,15136	7	1,37553	2,180813	8	0,089947
<i>PNPLA2</i>	0,051846	0,041194	9	0,053739	0,032134	7	0,921805	0,327091	0,503982	6	0,011394	0,007845	6	0,155993
<i>POU5F1</i>	0,476878	0,176836	10	0,611209	0,313491	9	0,259468	2,72469	3,671152	7	0,267898	0,489089	8	0,082136
<i>PPARA</i>	0,103371	0,059906	10	0,125376	0,043878	9	0,378564	0,23434	0,17531	7	0,124466	0,28116	8	0,389035
<i>PPARG</i>	1,057301	0,349871	10	1,198791	0,348199	9	0,390004	0,637804	0,455799	7	0,442923	0,181498	8	0,284183
<i>PPARGC1A</i>	0,419471	0,212055	10	0,484912	0,167379	9	0,469077	n.d.	n.d.	0	0,005594	0,006167	2	-
<i>PRDX1</i>	8,665754	6,508698	10	10,78006	5,62104	9	0,461462	178,3089	242,0662	7	10,82408	23,86184	8	0,072203
<i>PRDX3</i>	0,531641	0,2979	10	1,077159	0,52625	9	0,011807	11,62352	18,62016	7	0,588475	1,150131	8	0,116461

Gene	OÓCITO							CÉLULAS DO CUMULUS						
	B-CFA			A-CFA				B-CFA			A-CFA			
	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de p	\bar{X}	DP	N	\bar{X}	DP	N	valor de P
PTGS2	0,102306	0,096502	10	0,076288	0,043457	9	0,468016	0,001086	0,001346	3	0,005257	0,00238	6	0,028038
PTX3	0,002278	0,003164	2	n.d.	n.d.	0	-	n.d.	n.d.	0	0,000143	3,62E-05	3	-
REST	0,013364	0,015668	9	0,006727	0,006191	6	0,345977	0,000213	n.d.	1	0,000421	0,000489	5	-
RGS2	8,012759	4,170268	10	8,32642	3,496282	9	0,861986	0,031745	0,022548	7	0,004156	0,002703	6	0,01297
RPL15	0,006267	0,010905	10	164169,1	240645,4	9	0,044957	53445866	1,21E+08	7	3338560	9086804	8	0,261984
SOD1	2,632705	1,125591	10	2,871767	1,172985	9	0,656157	7,758327	6,956024	7	1,251763	1,730869	8	0,023331
SOD2	0,833289	0,572939	4	0,448053	0,129268	3	0,31449	0,045189	0,042871	4	0,055244	0,012075	3	0,715118
SOX2	0,10247	0,117979	10	0,044632	0,080632	9	0,234468	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	0	-
SREBF1	0,023419	0,016033	10	0,019231	0,017472	5	0,650518	0,001177	0,000903	6	0,012808	0,008246	6	0,006392
SREBF2	0,076775	0,084899	9	0,014615	0,01143	6	0,101739	0,009658	0,009669	3	0,010003	0,007325	6	0,953336
STAT3	6,662478	3,359108	10	6,125093	1,592023	9	0,667684	1,271592	0,93007	7	0,335738	0,376599	8	0,021107
TFAM	0,010283	0,00547	9	0,024895	0,015747	9	0,01821	0,162334	0,109641	7	0,052853	0,05768	8	0,02818
TNFAIP6	0,005497	n.d.	1	n.d.	n.d.	0	-	0,001454	0,001937	4	0,001295	0,00072	2	0,919811
TNFRSF21	0,063716	0,07226	10	0,084978	0,074224	9	0,53563	2,566906	3,466652	7	0,114859	0,128222	8	0,065642
TP53	0,037857	0,03356	10	0,061622	0,017549	9	0,074554	7,019983	11,6249	7	0,473575	1,077184	8	0,135027
VCAN	0,12793	0,105321	10	0,169438	0,177663	9	0,538665	1,878044	1,129658	7	1,629428	0,521104	8	0,584841
XBP1	0,125604	0,068638	10	0,220361	0,098334	9	0,025047	2,786046	2,34298	7	0,333606	0,577121	8	0,012971