



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DEBORAH NAKAYAMA YOKOMIZO

**IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES GONADOTRÓFICOS
EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS*
DE ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

DEBORAH NAKAYAMA YOKOMIZO

**IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES GONADOTRÓFICOS
EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS*
DE ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em 2024 da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Camila Bizarro da Silva.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Y54i Yokomizo, Deborah Nakayama.
Imunomarcção de receptores gonadotróficos em folículos ovarianos de vacas *Bos indicus* de alta e baixa contagem de folículos antrais / Deborah Nakayama Yokomizo. - Londrina, 2024.
2024 f. : il.

Orientador: Marcelos Marcondes Seneda.
Coorientador: Camila Bizarro da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Imuno-histoquímica - Tese. 2. Folículos ovarianos - Tese. 3. Bovinos - Tese. 4. Contagem de folículos antrais - Tese. I. Seneda, Marcelos Marcondes. II. da Silva, Camila Bizarro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

DEBORAH NAKAYAMA YOKOMIZO

**IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES GONADOTRÓFICOS
EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS*
DE ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em 2024 da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes
Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Amanda Fonseca Zangirolamo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Wanessa Blaschi
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina, 29 de fevereiro de 2024.

Dedico este trabalho a minha mãe, Regina Nakayama, que sempre me assegurou todo o amor e cuidado. Prometo que vou te amar para sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, pai e amiga, Regina Nakayama. Pela sua vida e pela sua morte. Não sei por que decidi escrever os meus agradecimentos a você no dia de hoje, no dia em que se completa cinco anos da sua partida desse plano físico. Mas acredito que seja simbólico te agradecer especialmente hoje (e sempre). As comemorações hoje em dia têm sido um misto de emoções. A alegria e a euforia de ter completado mais uma etapa da vida, e o orgulho que sinto de tudo o que conquistei, são incríveis. E ao mesmo tempo, a tristeza que me escorre em lágrimas e a dor no peito que só a ausência de quem amamos pode causar, estão presentes. A falta que você me faz nesses momentos felizes da vida é desesperador e solitário. Sou o que sou principalmente pelo que aprendi com você, e como sou grata por isso mãe. Sou grata por cada detalhe da sua vida. Pela honra de ter nascido como a sua filha e pelas enormes aventuras que vivemos juntas. E grata por tudo que vivi e que estou vivendo, mesmo após a sua morte. Não é fácil. Dói, mas é abençoado e radiante viver o seu legado com todos que te amam. E eu sigo mãe, acreditando que o melhor dia é hoje e prometendo te amar para sempre, e por toda a eternidade.

Ao Aurélio Izumi, meu namorado, melhor amigo, e parceiro. Me acolhe e vive comigo as minhas alegrias mais puras e eufóricas, e as minhas mais profundas dores e dias de absurdas tristezas. A você meu amor, minha eterna gratidão. Obrigada por compartilhar comigo essa caminhada pela cordilheira que é a vida. É com você que quero contemplar a vista do topo de cada montanha e atravessar qualquer vale que nos for proposto. Meu amor se transforma todos os dias por você e sou grata pela família que nos tornamos. Sinto uma felicidade absurda pela oportunidade de planejar nossa casa no mato, com vários cachorros e gatos que teremos juntos. Meu coração pulsa euforicamente por você do mesmo jeito desde a primeira vez, a dez anos atrás. Muito obrigada por tudo, eu te amo!

A minha família e amigos. Vocês são um dos pilares da minha vida. Eu amo vocês. É um privilégio poder compartilhar a vida ao lado de pessoas brilhantes, e sou extremamente grata em celebrar as minhas conquistas e a de vocês. E acolher cada desafio que aparecer. Vocês são a fonte da minha força e alegria de viver, obrigada pelo prazer de respirar ao lado de pessoas tão grandiosas.

Ao meu querido professor, orientador e com muito carinho, posso chamar de meu amigo, Professor Marcelo Marcondes Seneda. Me faltam palavras para expressar a gratidão que tenho pelo privilégio de ser sua orientada. Suas palavras ao longo desses anos me iluminam e acalentam a minha alma. É um prazer poder dividir essa alegria que estou sentindo em completar o meu mestrado com você. Eu admiro e respeito o profissional grandioso que é, e ainda mais pelo espírito de luz que posso conviver todos os dias. Muito obrigada, e estou animada para os próximos projetos que poderemos realizar!

Agradeço a todos que preenchem a equipe maravilhosa do Repra. Compartilhar o cotidiano com vocês é leve, enriquecedor e divertido. Aos meus amigos queridos: Juliane, Higor, Camila, Gabriela e Pamela, meu muito obrigada, com certeza vocês são presentes e parte dessa conquista. Agradeço também a melhor estagiária que poderia existir, Ana Karolyne, por compartilhar essa conquista comigo. Eu vibro pelo seu sucesso.

Agradecimento em especial a amiga que conquistei nessa jornada, Mariana Moreira dos Anjos. Minha amiga, meus mais sinceros agradecimentos pelo nosso todo o dia. Obrigada por apreciar comigo diversas xícaras de cafés e os pequenos surtos. Você foi essencial para a conclusão dessa etapa tão importante para mim. Nossas conversas diárias e planos mirabolantes tornaram a minha vida muito divertida e cheia de aprendizado. Que a vida nos proporcione mais caminhos lado a lado, subindo cada degrau e aproveitando a viagem.

Ao professor Fábio Morotti, que tive o prazer de conhecer na graduação, e pude admirar e respeitar ainda mais o profissional e o professor incrível que é na pós-graduação. Sou extremamente grata por ter a oportunidade de conviver com uma pessoa maravilhosa e um profissional tão íntegro.

A professora Amanda Zangirolamo, por todos os ensinamentos e palavras de conforto. Sua dedicação e ternura são únicos. Sou muito grata e alegre por ter te conhecido.

A equipe do Laboratório de Patologia Animal, que me orientaram e me ensinaram os procedimentos histológicos com tanto zelo. Agradecimento a Ana Xavier, por me ensinar a imuno-histoquímica, além de compartilhar as peripécias dos nossos gatinhos.

A minha Universidade Estadual de Londrina e a todos os colaboradores que compõem essa incrível universidade. Tenho orgulho de ser UEL. Agradeço a CAPES pela bolsa científica concedida, essencial para a conclusão deste trabalho e a todos os responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. À Helenice, por todo o suporte e orientação ao longo desses dois anos. Muito obrigada!

RESUMO

YOKOMIZO, Deborah Nakayama. **Imunomarcção de receptores gonadotróficos em folículos ovarianos de fêmeas *Bos indicus* de alta e baixa contagem de folículos antrais.** 2024. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A contagem de folículos antrais (CFA) é uma característica de alta repetibilidade individual e possui relação positiva com a fertilidade de vacas *Bos taurus* de alta CFA, porém o mesmo não ocorre no gado *Bos indicus* de alta CFA. Os mecanismos pelos quais vacas zebuínas com baixa CFA apresentam melhor capacidade reprodutiva e respostas às biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial em tempo fixo, até este momento não é bem compreendido. Um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de um folículo e pela divergência folicular para a formação de um folículo dominante são os receptores gonadotróficos. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a imunoexpressão de receptores de FSH (FSHr) e LH (LHr) nos folículos ovarianos de vacas de alta e baixa CFA. Para isso, foram coletados ovários de 20 vacas Nelore cíclicas de um frigorífico local, realizada a classificação da CFA (≥ 3 mm) e separado o grupo de alta CFA (≥ 30 folículos antrais, $n=10$) e baixa CFA (≤ 15 folículos antrais, $n=10$). Posteriormente, realizou-se a imuno-histoquímica para receptores de FSH e de LH, e a análise da intensidade de imunomarcção por meio da extensão IHC *profiler* do *software* Image J nos folículos pré-antrais (folículo primordial, primário e secundário) e folículos antrais. A intensidade de imunomarcção dos receptores foi avaliada através da ANOVA com efeito misto ajustado, tendo como fatores fixos o grupo CFA (alta e baixa) e o estágio de desenvolvimento (folículos pré-antrais e antrais). O teste de Tukey foi aplicado como teste de média post hoc em caso de efeito significativo. Foi considerado diferença significativa quando $P \leq 0,05$. Todas as categorias de desenvolvimento folicular foram imunomarcadas independente dos receptores. A intensidade de imunomarcção para FSHr teve interação entre o grupo CFA e o estágio de desenvolvimento folicular, em que os folículos pré-antrais de baixa CFA apresentaram uma maior intensidade de imunomarcção ($120,74 \pm 2,20$ vs $139,46 \pm 1,74$, $P = 0,026$). A intensidade de imunomarcção para receptor de FSH dos folículos antrais do grupo de baixa CFA foi maior em relação ao grupo de alta CFA ($135,69 \pm 2,88$ vs $152,38 \pm 2,27$, $P = 0,032$). Houve uma maior intensidade de imunomarcção para LHr de vacas do grupo de baixa CFA em relação ao grupo de alta CFA ($115,54 \pm 1,72$ vs $129,38 \pm 1,40$, $P = 0,05$). Em conclusão, vacas *Bos indicus* de baixa CFA apresentaram imunomarcção mais intensa de receptores de FSH e LH em seus folículos ovarianos.

Palavras-chaves: Desenvolvimento folicular; Receptor de FSH; Receptor de LH; Bovinos; Imunomarcção;

ABSTRACT

YOKOMIZO, Deborah Nakayama. **Immunostaining of gonadotropic receptors of *Bos indicus* cows with high and low antral follicle count.** 2024. 49 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

The antral follicle count (AFC) is a highly repeatable individual characteristic and is positively related to the fertility of *Bos taurus* cows with high AFC. However, the same does not occur in *Bos indicus* cattle with high AFC. The mechanisms by which zebu cows with low AFC exhibit better fertility, reproductive capacity, and responses to reproductive biotechnologies such as fixed-time artificial insemination are not well understood at this point. One of the factors responsible for follicular development and follicular divergence leading to the formation of a dominant follicle is gonadotropin receptors. Therefore, this study aimed to assess the difference in immunostained intensity of FSH (FSHr) and LH (LHr) receptors in ovarian follicles of *Bos indicus* cows with high and low antral follicle count (AFC). For this purpose, ovaries from twenty cyclic Nelore cows were collected from a local abattoir, AFC classification (≥ 3 mm) was performed, and the high (≥ 30 antral follicles, $n=10$) and low (≤ 15 antral follicles, $n=10$) AFC groups were separated. Subsequently, immunohistochemistry for FSH and LH receptors was conducted, and the intensity of immunostaining was analyzed using the IHC profiler extension of the Image J software in pre-antral follicles (primordial, primary, and secondary follicles) and antral follicles. The immunostaining intensity of the receptors was evaluated using mixed-effects ANOVA, with the AFC group (high and low) and developmental stage (pre-antral and antral follicles) as fixed factors. Tukey's test was applied as a post hoc mean test in case of a significant effect. A significant difference was considered when $P \leq 0.05$. All follicular development categories were immunolabeled regardless of the receptors. The immunostaining intensity for FSHr had an interaction between the AFC group and follicular developmental stage, where pre-antral follicles with low AFC showed higher immunostaining intensity (120.74 ± 2.20 vs 139.46 ± 1.74 , $P = 0.026$). The immunostaining intensity for FSH receptors in antral follicles of the low AFC group was higher compared to the high AFC group (135.69 ± 2.88 vs 152.38 ± 2.27 , $P = 0.032$). There was a higher immunostaining intensity for LHr in cows with low AFC compared to those with high AFC (115.54 ± 1.72 vs 129.38 ± 1.40 , $P = 0.05$). In conclusion, *Bos indicus* cows with low AFC showed more intense immunostaining of FSH and LH receptors in their ovarian follicles.

Key-words: Follicular development; FSH receptor; LH receptor; Cattle; Immunostaining.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Ilustração representativa de ovário bovino 15
- Figura 2** – Ilustração dos estágios de desenvolvimento folicular. 17
- Figura 3** – Esquema ilustrativo da ação dos receptores de FSH e LH 19

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Análise de folículo ovariano bovino, imunomarcado para receptor de FSH por meio do *software* Image J. A: Imagem original submetida a extensão *IHC profiler*; B: Imagem da coloração de hematoxilina, após a separação os canais de cor; C: Imagem da marcação do DAB; D: Imagem representando a região de interesse delimitada para a mensuração da intensidade da imunomarcção do DAB. Aumento de 40 x; escala de 50 μ m 36
- Figura 2** – Escala de intensidade de pixel separada por intervalos de intensidade de acordo com o que foi proposto por Fuhrich, Lessey e Savaris (2013)..... 37
- Figura 3** – Análise de folículo ovariano bovino do controle negativo submetido ao *software* Image J com a extensão *IHC profiler*. A: Imagem original do controle negativo; B: Imagem com a coloração da hematoxilina; C: Imagem com a coloração do DAB. Aumento de 40 x; escala de 50 μ m 37
- Figura 4** – Imunomarcção para receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) nas imagens A-D, e para receptor de hormônio luteinizante (LHr) nas imagens E-H. Aumento de 40 x; escala = 50 μ m 38
- Figura 5** – Frequência dos intervalos de intensidade de imunomarcção para FSHr em folículos ovarianos de animais de alta e baixa CFA 41
- Figura 6** – Frequência dos intervalos de intensidade de imunomarcção para LHr em folículos ovarianos de animais de alta e baixa CFA 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
AMPC	Monofosfato de Adenosina Cíclico
CFA	Contagem de Folículo Antral
CG	Células da Granulosa
CGP	Células Germinativas Primordiais
CL	Corpo Lúteo
CT	Células da Teca
FD	Folículo Dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHr	Receptor de Hormônio Folículo Estimulante
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	Hormônio Luteinizante
LHr	Receptor de Hormônio Luteinizante
MMT	Milhões de Toneladas Métricas
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USDA	Departamento da Agricultura dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Morfologia ovariana	15
2.2	Folículos ovarianos.....	16
2.3	Desenvolvimento folicular.....	17
2.4	Gonodotrofinas.....	18
2.5	Contagem de folículos antrais	21
2.5.1	Influência Reprodutiva da CFA	21
3	REFERÊNCIAS	23
4	HIPÓTESE	30
5	OBJETIVOS.....	30
5.1	Objetivo geral	30
5.2	Objetivos específicos	30
6	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES GONADOTRÓFICOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE FÊMEAS <i>Bos indicus</i> DE ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS.....	31
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 Segundo o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA,
4 2023), o Brasil é o terceiro maior produtor de gado do mundo e o maior exportador de
5 carne. A exportação de carne prevista para 2024 de 3,40 milhões de toneladas
6 métricas (MMT), 30% de toda a produção total de carne bovina do país. Em 2022, o
7 rebanho bovino chegou ao recorde de 234,4 milhões de animais, representando
8 grande importância para a economia brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e
9 Estatística – IBGE, 2023). Este crescimento é viabilizado por meio de melhorias na
10 nutrição, manejo e aplicação de biotécnicas reprodutivas como, por exemplo, a
11 inseminação artificial (BARUSELLI et al., 2019).

12

13 Visto tal demanda, desafios como contornar a subfertilidade e a atingir
14 a maior eficiência de produção são almejados. Nesse contexto, a contagem de
15 folículos antrais (CFA), uma característica de alta repetibilidade individual, vem sendo
16 estudada como forma de auxiliar na seleção de fêmeas para a reprodução. Sendo
17 possível categorizar as fêmeas em grupos de alta, baixa e intermediária CFA (BURNS
18 et al., 2005). Muitos estudos relacionaram animais *Bos taurus* de baixa CFA com uma
19 baixa performance reprodutiva (CUSHMAN et al., 2009; IRELAND et al., 2007;
20 MOSSA et al., 2012). Contudo, pesquisas envolvendo a subespécie *Bos indicus*
21 relataram melhor capacidade reprodutiva quando aplicado a inseminação artificial em
22 tempo fixo (IATF) (MOROTTI et al., 2022). Além disso, foi relatado um maior diâmetro
23 de folículo dominante e maior concentração de progesterona em vacas com baixa
24 CFA em comparação com as de alta CFA (LIMA et al, 2020). Diante disso, cabe
25 ressaltar que o estudo de Ribeiro Filho e colaboradores (2013) relatou a associação
26 de melhores resultados na taxa de concepção de fêmeas que tiveram maior diâmetro
27 folicular no momento da IATF.

28

29 Dentre os fatores regulatórios para o desenvolvimento folicular, estão
30 as gonadotrofinas hipofisárias: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio
31 luteinizante (LH) e seus respectivos receptores (BEG; GINTHER, 2006). Os folículos
32 que se desenvolvem como dominantes demonstraram ser mais sensíveis ao FSH e
capazes de utilizá-los em baixas concentrações, e a expressão de receptores para LH
foi maior nos folículos dominantes, portanto a presença desses receptores indica uma

33 importância na seleção de dominância e evolução (BEG et al., 2001; GINTHER et al.,
34 2001; ROCHE, 2004).

35 O desenvolvimento adequado das células foliculares são fatores
36 importantes na fertilidade e qualidade do oócito, e apesar dos estudos estarem em
37 ascensão, este tema é complexo e ainda é pouco compreendido (FIGUEIREDO et al.,
38 2019). Até o momento não encontramos estudos que identificaram a diferença na
39 presença de receptores gonadotróficos entre os grupos de alta e baixa CFA de vacas
40 *Bos indicus*. Sendo assim, de forma que possa contribuir para a compreensão das
41 diferenças fisiológicas e permitir uma maior eficiência no uso da classificação da CFA,
42 o objetivo do trabalho foi avaliar a diferença na imunexpressão de receptores de FSH
43 e LH nos folículos ovarianos de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) de alta e baixa
44 contagem de folículos antrais (CFA).

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66 2 REFERENCIAL TEÓRICO

67

68 2.1 Morfologia ovariana

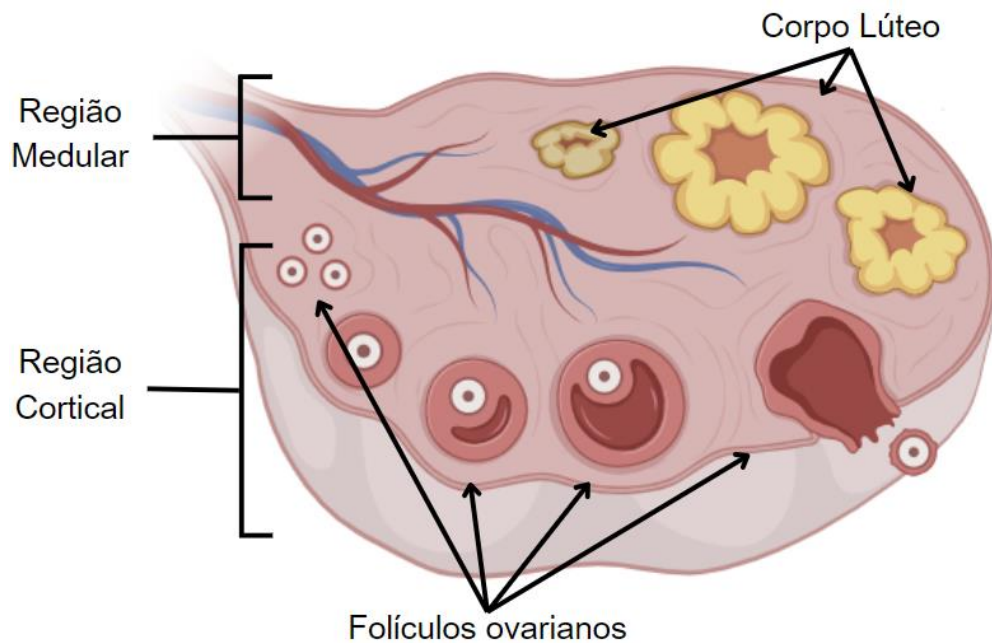
69

70 Os ovários são órgãos do sistema reprodutivo feminino originados
71 pelo espessamento do epitélio celomático localizados próximos a parede abdominal
72 ventral nos ruminantes (SMITH; WILHELM; RODGERS, 2014). São responsáveis
73 pela produção dos principais hormônios reprodutivos (progesterona e estrógeno), que
74 atuam no desenvolvimento e maturação dos oócitos, além das características sexuais
75 femininas secundárias e manutenção da prenhez (MCGEE; HSUEH, 2000; KÖNIG;
76 LIEBICH, 2016; REECE, 2017).

77 A superfície do ovário é recoberta pelo epitélio germinativo, de epitélio
78 pavimentoso ou cúbico simples, seguido pela túnica albugínea, um tecido conjuntivo
79 denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O ovário da vaca (Figura 1) é dividido em
80 região cortical, a porção mais externa, onde encontra-se os folículos ovarianos e os
81 corpos lúteos, envoltos pelo estroma (FIGUEIREDO, et al., 2019). A região medular,
82 porção mais interna do ovário, é composta por vasos sanguíneos e linfático, músculo
83 liso e tecido conjuntivo frouxo, sem uma separação muito definida entre a região
84 cortical e medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KÖNIG; LIEBICH, 2016; REECE,
85 2017).

86

87 **Figura 1-** Ilustração representativa de ovário bovino.



88

89 Fonte: Adaptado de König; Liebich (2016).

90

91 2.2 Folículos ovarianos

92

93 O desenvolvimento folicular e ovariano ocorre ainda na vida
 94 embrionária, com as sucessivas mitoses das células germinativas primordiais (CGP)
 95 e o seu desenvolvimento em oócitos, os quais iniciam o seu crescimento até a prófase
 96 da primeira meiose. Esses oócitos são envolvidos por uma camada de células da
 97 granulosa pavimentosa, de origem mesonéfrica (FAIR, 2003).

98

99 Os folículos ovarianos podem ser classificados em folículos pré-
 100 antrais, grupo composto por folículos primordiais, primários e secundários, e os
 101 folículos antrais (FIGUEIREDO et al., 2019). O folículo primordial, consiste no oócito
 102 imaturo (quiescente em prófase I), envolto por uma camada de células da granulosa
 103 pavimentosa, de aproximadamente 40 μm de diâmetro, sem a presença da zona
 104 pelúcida (ZP) (MELLO et al., 2013).

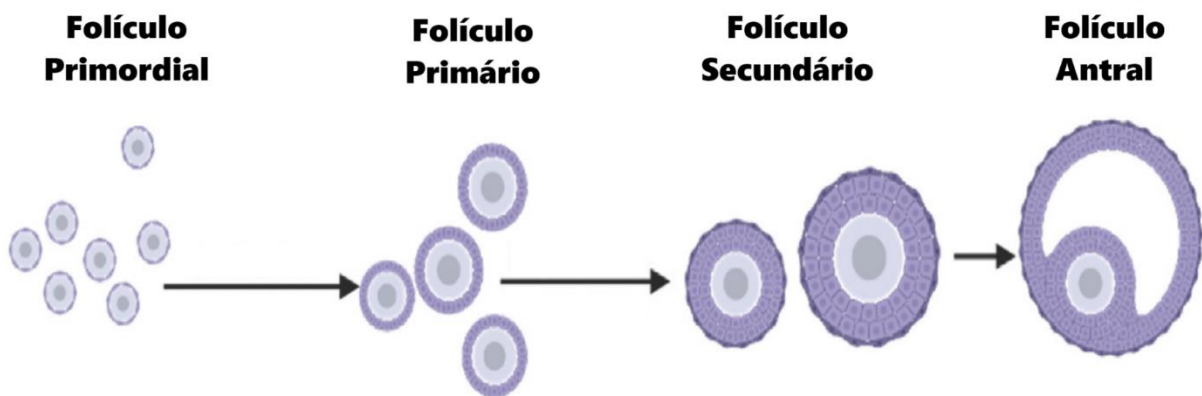
104

105 Os folículos primários são formados por uma camada de células da
 106 granulosa cuboides e com o início da formação da ZP. A multiplicação das células
 107 da granulosa e o aumento do volume do oócito (aproximadamente 200 μm) conforme
 108 seu desenvolvimento, dá origem ao folículo secundário (LIMA-VERDE; ROSSETTO;
 109 FIGUEIREDO, 2011). E por fim, com o desenvolvimento e a organização das células
 da granulosa, há a formação de uma cavidade preenchida por líquido folicular,

110 denominada de antro, e início da diferenciação das células da teca interna e externa,
 111 o folículo é então classificado como folículo antral ou terciário (FIGUEIREDO et al.,
 112 2011; LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011; MELLO et al., 2013, Figura
 113 2).

114

115 **Figura 2** – Ilustração dos estágios de desenvolvimento folicular.



116

117 Fonte: Adaptado de Uju; Unniappan, 2024.

118

119 **2.3 Desenvolvimento folicular**

120

121 O padrão de crescimento folicular em bovinos foi primeiramente
 122 sugerido como um padrão de ondas em 1960 por Rajakoski, e vários outros estudos
 123 relataram o mesmo modelo de desenvolvimento (GINTHER; KASTELIC; KNOPF,
 124 1989; ROCHE, 2004). Há diferenças entre o número de ondas de desenvolvimento
 125 folicular entre as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*. Em fêmeas taurinas (*Bos*
 126 *taurus*) é relatado uma predominância de duas a três ondas de crescimento folicular
 127 durante o ciclo estral (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989; ROCHE, 2004), já em
 128 fêmeas zebuínas (*Bos indicus*) apresentam predominantemente três ondas, podendo
 129 chegar a quatro ondas por ciclo (FIGUEIREDO et al., 1997).

130

131 No decorrer de uma onda folicular, há a ativação de um grupo de
 132 folículos quiescentes (recrutamento ou emergência folicular), que iniciam seu
 133 desenvolvimento (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989). No momento chamado de
 divergência folicular desse grupo de folículos, apenas um folículo (folículo dominante)

134 é selecionado e continua o seu desenvolvimento, enquanto os outros folículos deixam
135 de se desenvolver e sofrem atresia (folículos subordinados) (KNOPF et al., 1989;
136 GINTHER et al., 2001). Dependendo do momento em que este folículo dominante
137 diverge, pode se tornar um folículo anovulatório, quando não há o pulso suficiente do
138 hormônio luteinizante (LH), e assim sofrer atresia, permitindo um novo recrutamento
139 folicular (WEBB et al., 1995). Entretanto, quando o folículo dominante estiver presente
140 e haver a regressão luteínica, permitindo o pico de LH, ocorre a ovulação (WEBB et
141 al., 1995; WEBB; CAMPBELL, 2007; FIGUEIREDO et al., 2018).

142 Existem algumas particularidades entre as subespécies *Bos taurus* e
143 *Bos indicus*. Além do número de ondas, observou um recrutamento folicular maior em
144 vacas zebuínas em relação as vacas taurinas (CARVALHO et al., 2008). O maior
145 recrutamento folicular pode estar relacionado aos fatores de crescimento semelhante
146 à insulina (IGF), já que as concentrações plasmáticas de IGF-I são maiores em vacas
147 zebuínas (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000). Compreender as diferentes
148 características fisiológicas e reprodutivas entre essas subespécies, possibilita
149 aumentar a eficiência do uso de técnicas como OPU/PIV e TE (BARUSELLI;
150 GIMENES; SALES, 2007).

151 Outra diferença fisiológica está em relação ao diâmetro do folículo
152 dominante e o diâmetro máximo alcançado. Alguns autores descreveram que o
153 diâmetro do FD no momento do desvio foi de 5 e 6 mm, e o diâmetro máximo foi de
154 10 a 11 mm para vacas *Bos taurus* (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007;
155 GIMENES et al., 2008). Enquanto para *Bos indicus*, o diâmetro é bem maior, podendo
156 chegar a 8 e 9 mm no momento do desvio, e de 13 a 14 mm de diâmetro máximo
157 (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989; SARTORI et al., 2001).

158

159 **2.4 Gonadotrofinas**

160

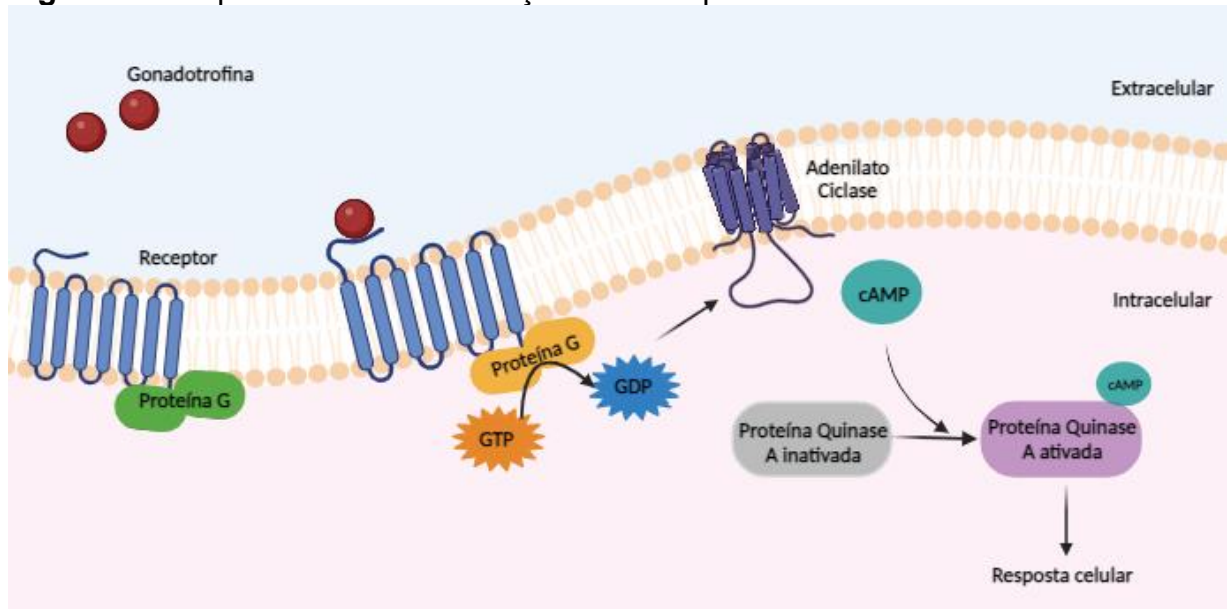
161 Diversos fatores hormonais estão envolvidos no desenvolvimento
162 folicular durante o ciclo estral bovino, e são modulados pelo eixo hipotálamo-hipófise
163 gonadal, como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônio folículo
164 estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrógeno, progesterona, inibina,
165 prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) entre outros (ROCHE, 1996). As gonadotrofinas (FSH e
166 LH) são os principais hormônios envolvidos nas funções reprodutivas de mamíferos.

167 São glicoproteínas liberadas pela adeno-hipófise ao ser estimulada pelo GnRH
 168 (DUFAU et al., 1995; KADOKAWA et al., 2014; STAMATIADES; KAISER, 2018).

169 O FSH e o LH atuam por meio de receptores de membranas
 170 específicos, acoplados a proteína G, presentes nas células da granulosa e células da
 171 teca (DUFAU et al., 1995; SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997). São receptores
 172 de estruturas semelhantes, porém a união da gonadotrofina ao domínio extracelular é
 173 específica para cada hormônio (SARAIVA et al., 2010). Com a ocorrência da ligação
 174 do ligante ao receptor, promove-se a ativação da proteína G, que ao gerar o AMP
 175 cíclico (cAMP) aciona a cascata de fosforilação de proteínas quinases (PK-A),
 176 controlando diversos aspectos da função celular (SARAIVA et al., 2010, Figura 3)

177

178 **Figura 3** – Esquema ilustrativo da ação dos receptores de FSH e LH.



179

180 Adaptada de Saraiva et al. (2010)

181

182 A ligação entre o FSH e o seu receptor estimula reações intracelulares
 183 que envolvem a expressão de diversos genes associados a proliferação celular,
 184 diferenciação das células da granulosa, síntese de esteroides, expressão de
 185 receptores dos fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante a
 186 insulina 1 (IGF-1), e a indução a formação do antro (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005;
 187 HUNZICKER-DUNN MAIZELS, 2006; SARAIVA et al., 2010). Ademais, o FSH faz
 188 parte da regulação da ocorrência das ondas foliculares (duas ou três ondas) em
 189 fêmeas bovinas, visto que o surgimento da onda está relacionado ao aumento

190 transitório das concentrações plasmáticas de FSH (ADAMS et al., 1992; HAMILTON
191 et al., 1995; ROCHE, 2004).

192 Ao longo dos anos, estudos demonstraram a importância do FSH
193 durante o desenvolvimento folicular inicial (TURZILLO; FORTUNE, 1990; ADAMS et
194 al., 1992; TARU SHARMA; DUBEY; SAI KUMAR, 2011). Adams e colaboradores
195 (1992) observaram que a queda das concentrações plasmáticas de FSH atrasou o
196 início da emergência folicular, detectado ao ultrassom. Neste mesmo estudo,
197 identificou-se que o folículo dominante não foi afetado pela queda das concentrações
198 plasmáticas de FSH, o que o autor sugeriu o fato do folículo dominante ser menos
199 dependente a essa gonadotrofina, ou ser mais sensível devido ao aumento do número
200 de receptores (ADAMS et al., 1992).

201 Quando aplicado ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de búfalas,
202 o grupo de pesquisa de Taru Sharma (2011), verificou um aumento na taxa de
203 sobrevivência e no diâmetro de folículos pré-antrais após a adição de 1 µg/ml de FSH
204 no meio, em dez dias de cultivo. Além disso, o FSH também está envolvido na
205 estimulação da expressão de receptores de LH durante o desenvolvimento folicular
206 (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

207 O hormônio luteinizante (LH) tem como principal função o
208 desenvolvimento folicular, desvio e dominância folicular, estimulação da enzima
209 esteroideogênica (aromatase p450) de folículos não ovulatórios, na luteinização das
210 células da granulosa e teca interna, e viabilizar a ovulação (FORTUNE et al., 1991;
211 RHODES et al., 1995; GINTHER et al., 1996; GONG et al., 1996; EPPIG et al., 1997;
212 GINTHER, 2000;). O LH assim como o FSH, atua por meio de receptor específico,
213 acoplado a proteína G. A aquisição dos receptores de LH tem um papel importante no
214 desvio e manutenção da dominância folicular (XU et al., 1995). O folículo dominante
215 esperado tem um aumento na concentração de mRNA dos receptores de LH, além da
216 maior produção de esteroides em relação aos subordinados (LUO et al., 2011). Do
217 mesmo modo, o LH aumenta a sensibilidade das células da granulosa em responder
218 ao FSH, e está envolvido na supressão da atresia folicular e apoptose das células da
219 granulosa (HATTORI et al., 2018). Portanto, o desenvolvimento dos folículos, desde
220 a sua ativação e maturação dependem da ação conjunta de FSH e LH (GRUENBERG;
221 STEGER; PELUSO, 1983).

222

223 2.5 Contagem de folículos antrais

224

225 A contagem de folículos antrais (CFA) foi estudada e proposta como
226 uma característica reprodutiva pela primeira vez em 2005 por Burns e colaboradores,
227 os quais avaliaram o número de folículos antrais de vacas Holandesas e constataram
228 uma alta variabilidade entre os indivíduos, e alta repetibilidade (0,95) no mesmo
229 animal. Diversos outros estudos verificaram que o parâmetro se repetia
230 independentemente de raça, número de ondas foliculares, momento do ciclo estral,
231 idade, condições de manejo, condição corporal e estado reprodutivo (BURNS et al.,
232 2005; IRELAND et al., 2007; CUSHMAN et al., 2009; MORAES et al., 2019).

233 A CFA pode ser avaliada através da ultrassonografia transretal a partir
234 da contagem de folículos antrais com diâmetro ≥ 3 mm dos ovários (BURNS et al.,
235 2005; MOROTTI et al., 2018) ou, na condição *post mortem*, pela avaliação visual dos
236 folículos na superfície do ovário (CUSHMAN et al., 2009; ROSA et al., 2018).

237 Morotti e colaboradores (2022) avaliaram três métodos de
238 classificação da CFA: média e desvio padrão, quartil e de escore (I: baixa ≤ 15
239 folículos; II: intermediário 16 a 30 folículos; III: alta 31 a 40 folículos e IV: super alta \geq
240 30 folículos), sendo o método de classificação por escore o mais indicado por esses
241 autores para facilitar e padronizar a CFA.

242

243 2.5.1 Influência reprodutiva da CFA

244

245 A CFA está ligada a diversos estudos relacionados à fertilidade. Vacas
246 com alta CFA respondem melhor à superovulação (IRELAND et al., 2007), possuem
247 uma maior taxa de prenhez ao serem submetidas a inseminação artificial (CUSHMAN
248 et al., 2009; MOSSA et al., 2012), maior concentração de hormônio anti-mulleriano
249 (AMH) (IRELAND et al., 2008), além de melhores resultados na produção de
250 embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (IRELAND et al., 2007; JIMENEZ-KRASSEL et
251 al., 2009; SILVA-SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016). De maneira oposta,
252 vacas *Bos taurus* de baixa CFA foram associadas a baixa fertilidade (MOSSA et al.,
253 2012) e baixa capacidade em responder ao FSH (IRELAND et al., 2007; SCHEETZ et
254 al., 2012).

255 Apesar disso, estudos com fêmeas Nelore de baixa CFA indicaram
256 uma melhor taxa de concepção (SANTOS et al., 2016; MOROTTI, et al., 2018;
257 MOROTTI et al., 2022). Sobretudo, os oócitos e complexo cumulus-oócitos (CCO)
258 apresentaram maior expressão de genes para o crescimento folicular (oócito: IGFBP2;
259 CCO: GSK3A, IGF1R e IGFBP2), resposta ao estresse (oócito: HSF; CCO:
260 HSP90AA1, HSPA5, HSPD1, SOD1 e PRDX3), comunicação intercelular (oócitos:
261 BMP15, HAS2 e EGFR; CCO: EGFR), e controle meiótico (oócitos e CCO: NPR2 e
262 NPR3) (DE LIMA et al., 2020).

263 Animais de baixa CFA apresentam maior diâmetro de folículo
264 dominante e folículo pré-ovulatório (MOROTTI et al., 2018; DE LIMA et al., 2020;
265 MOROTTI et al., 2022). Ribeiro Filho e colaboradores (2013) identificaram em um
266 estudo com 348 vacas Nelore, um maior diâmetro folicular no momento da IATF
267 relacionado a melhores resultados nas taxas de concepção (diâmetro folicular no
268 momento da IATF de fêmeas que ficaram gestantes $13,33 \pm 2,40$ mm vs $11,27 \pm 2,75$
269 mm não gestantes, $P = 0,0001$).

270 Outra diferença fisiológica também descrita entre animais com alta e
271 baixa CFA, foi que animais com um menor número de folículos antrais tiveram maiores
272 concentrações de FSH (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2008; MOSSA et al.,
273 2010). E apesar da melhor resposta à superovulação em vacas de alta CFA, a
274 proporção de embriões transferíveis foi melhor em vacas classificadas em baixa CFA
275 (IRELAND et al., 2008). Em relação a estratégias farmacológicas, a CFA influenciou
276 também na resposta ovariana de doadoras sujeitas a múltipla ovulação e transferência
277 de embriões (MOET) na dose administrada de FSH, em que vacas de baixa CFA
278 tiveram performance semelhante a vacas de alta CFA com a maior dose de FSH (300
279 UI) (LOLLATO et al., 2022). Desta maneira, mais estudos são necessários para
280 compreender as diferenças relacionadas a fisiologia desses animais, visto a
281 importância das gonadotrofinas e a presença dos seus receptores para a regulação
282 das atividades intraovarianas e desenvolvimento folicular (UJU; UNNIAPPAN, 2024).
283 Desse modo, vislumbra-se a perspectiva de ajustes farmacológicos mais precisos,
284 para melhorar a performance e destinação a diferentes finalidades dependendo da
285 CFA dos animais. (MOROTTI et al., 2021; LOLLATO et al., 2022).

286

287

288 **3 REFERÊNCIAS**

289

290

291 ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J.
 292 Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of
 293 follicular waves in heifers. **Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 177–188, 1992.

294

295 ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.;
 296 STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian
 297 and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and
 298 Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of animal science**, v. 78, n. 5,
 299 p. 1291–1302, 2000.

300

301 BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. Â.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.;
 302 BATISTA, E. S.; CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial
 303 em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 308–314,
 304 2019.

305

306 BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de
 307 fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2,
 308 p. 205–211, 2007.

309

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

315

316 CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.;
 317 BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols
 318 in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.
 319 69, n. 2, p. 167–175, 2008.

320

321 CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C.
 322 Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during
 323 follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers.
 324 **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3–4, p. 189–196, 2007.

325

326 CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.;
 327 FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in
 328 crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age,
 329 and birth weight^{1,2}. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 1971–1980, 2009.

330

331 DE LIMA, M. A.; MOROTTI, F.; BAYEUX, B. M.; DE REZENDE, R. G.; BOTIGELLI,
 332 R. C.; DE BEM, T. H. C.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; MEIRELLES, F. V.;
 333 BARUSELLI, P. S.; DA SILVEIRA, J. C.; PERECIN, F.; SENEDA, M. M. Ovarian
 334 follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional
 335 patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. **Scientific
 336 Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

- 337
338 DE MORAES, F. L. Z.; MOROTTI, F.; COSTA, C. B.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA,
339 M. M. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy
340 rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 136, p. 10–14, 2019.
341
- 342 DUFAU, M. L.; HWA TSAI-MORRIS, C.; ZHI HU, Z.; BUCZKO, E. Structure and
343 Regulation of the Luteinizing Hormone Receptor Gene. **Journal of Steroid**
344 **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 6, p. 283 – 291, 1995.
345
- 346 EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes
347 suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by
348 granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976–984, 1997.
349
- 350 FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence.
351 **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 2003.
352
- 353 FIGUEIREDO, J. R.; CADENAS, J.; LIMA, L. F. de; SANTOS, R. R. Advances in in
354 vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 52,
355 2019.
356
- 357 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.
358 Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. **Reproduction,**
359 **Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 40–47, 2011.
360
- 361 FIGUEIREDO, J. R.; DE LIMA, L. F.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Control of
362 growth and development of preantral follicle: Insights from in vitro culture. **Animal**
363 **Reproduction**, v. 15, Supplement 1, p. 648–659, 2018.
364
- 365 FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian
366 follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8,
367 p. 1489–1505, 1997.
368
- 369 FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A. M.; LAVOIR, M. Follicle selection in
370 domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 187 – 198,
371 1991.
372
- 373 GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R.
374 S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.;
375 BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S.
376 Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.
377 69, n. 7, p. 852–858, 2008.
378
- 379 GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal**
380 **Reproduction Science**, v. 60–61, p. 61–79, 2000.
381 GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle
382 selection in monovular species. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 638–647,
383 2001.
384

- 385 GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of
386 follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.
387 20, n. 3, p. 187–200, 1989.
388
- 389 GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K.
390 Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p.
391 1187–1194, 1996.
392
- 393 GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A.
394 R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and
395 luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused
396 with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of reproduction**, v. 55, n.
397 1, p. 68–74, 1996.
398
- 399 GRUENBERG, M. L.; STEGER, R. W.; PELUSO, J. J. Follicular development,
400 steroidogenesis and ovulation within ovaries exposed in vitro to hormone levels
401 which mimic those of the rat estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 29, n. 5, p.
402 1265–1275, 1983.
403
- 404 HAMILTON, S. A.; GARVERICK, H. A.; KEISLER, D. H.; XU, Z. Z.; LOOS, K.;
405 YOUNGQUIST, R. S.; SALFEN, B. E. Characterization of ovarian follicular cysts and
406 associated endocrine profiles in dairy cows. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p.
407 890–898, 1995.
408
- 409 HATTORI, K.; ORISAKA, M.; FUKUDA, S.; TAJIMA, K.; YAMAZAKI, Y.; MIZUTANI,
410 T.; YOSHIDA, Y. Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and
411 Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle. **Endocrinology**, v. 159, n. 6, p.
412 2337–2347, 2018.
413
- 414 HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature
415 granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein
416 kinase A. **Cellular Signalling**, v. 18, n. 9, p. 1351, 2006.
417
- 418 IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.
419 W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within
420 individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the
421 proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human**
422 **reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 6, p. 1687–1695, 2007.
423
- 424 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
425 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.;
426 IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically
427 healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of**
428 **reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219–1225, 2008.
429
- 430 JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU,
431 X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that
432 high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on
433 the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of**
434 **reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1272–1281, 2009.

- 435
436 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª edição. Rio de Janeiro:
437 Guanabara Koogan, 2013.
438
- 439 KADOKAWA, H.; PANDEY, K.; NAHAR, A.; NAKAMURA, U.; RUDOLF, F. O.
440 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors of cattle aggregate on the
441 surface of gonadotrophs and are increased by elevated GnRH concentrations.
442 **Animal reproduction science**, v. 150, n. 3–4, p. 84–95, 2014.
443
- 444 KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian
445 follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring
446 individual follicles. **Domestic animal endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 111–119, 1989.
447
- 448 KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas**
449 **Colorido**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016.
450
- 451 LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios
452 esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, p.
453 472–482, 2011.
454
- 455 LOLLATO, J. P. M.; SOUZA, A. C. C.; SILVA, R. C. P.; MARQUES, M. O.;
456 CROZARA, A. S.; GONÇALVES, R. L.; CUNHA, L. S.; SENEDA, M. M.; MOROTTI,
457 F. In vivo embryo production in bovine donors with low and high antral follicle counts
458 superovulated with low and high FSH doses. **Livestock Science**, v. 262, 2022.
459
- 460 LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILTBANK, M. C. The role of luteinizing
461 hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in
462 cattle. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 369–378, 2011.
463
- 464 MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles.
465 **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.
466
- 467 MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial
468 follicle development. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 137, n. 1, p. 1–11,
469 2009.
470
- 471 MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SILVA, A. P. T. B.; MELLO, M. R. B.;
472 PALHANO, H. B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de**
473 **Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 328–333, 2013.
474
- 475 MOROTTI, F.; CAMARGO, H. S.; SILVA, L. O. L.; LORENZETTI, E.;
476 ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Contagem de folículos antrais: relação com
477 a eficiência das biotécnicas e fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução**
478 **Animal**, v. 45, n. 4, p. 202–209, 2021.
479
- 480 MOROTTI, F.; MIGUEZ-GONZALEZ, S.; CERZETTI, M. B.; SENEDA, M. M.
481 Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the
482 timed artificial insemination in cattle. **Animal reproduction**, v. 19, n. 1, 2022.
483

- 484 MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.;
485 RAMOS CERQUEIRA, P. H.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and
486 conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to
487 timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 170–177,
488 2018.
- 489
490 MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.
491 W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation
492 in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian
493 androgen production in cattle. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 140, n. 5, p.
494 713–720, 2010.
- 495
496 MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.;
497 LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of
498 ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows.
499 **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2355–2361, 2012.
- 500
501 RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special
502 reference to seasonal, cyclical, end left-right variations. **Acta endocrinológica**, v. 34,
503 Supplement 52, p. 1–68, 1960.
- 504
505 REECE, W. O. **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 13ª edição. Rio de
506 Janeiro: Roca, 2017.
- 507
508 RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Hormone
509 concentrations in the caudal vena cava during the first ovarian follicular wave of the
510 estrous cycle in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 104, n. 1, p. 33–
511 39, 1995.
- 512
513 RIBEIRO FILHO, A. D. L.; FERRAZ, P. A.; RODRIGUES, A. S.; CALMON
514 BITTENCOURT, T. C. B. D. S.; LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M. Diâmetro do
515 folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em
516 vacas nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 501–507, 2013.
- 517
518 ROCHE, J.F. Follicular Waves in Cattle. **Veterinary Research Communications**, v.
519 28, p. 107–110, 2004.
- 520
521 ROCHE, James F. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in
522 perspective. **Reviews of reproduction**, v. 1, n. 1, p. 19–27, 1996.
- 523
524 ROSA, C.; MARINHO, L.; DA ROSA, P.; DE CESARO, M.; LUNARDELLI, P.; SILVA-
525 SANTOS, K.; BASSO, A.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M. Molecular characteristics
526 of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and
527 high numbers of antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 4, p.
528 921–929, 2018.
- 529
530 SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.;
531 SANCHES, B. V.; DE MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High
532 numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production

- 533 but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal reproduction science**,
534 v. 165, p. 17–21, 2016.
- 535
- 536 SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.;
537 SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na
538 foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 206–221,
539 2010.
- 540
- 541 SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.;
542 BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos*
543 *indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, 2005.
- 544
- 545 SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M.
546 C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles.
547 **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.
- 548
- 549 SCHEETZ, D.; FOLGER, J. K.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Granulosa cells are
550 refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. **Reproduction**,
551 **Fertility and Development**, v. 24, n. 2, p. 327, 2012.
- 552
- 553 SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.;
554 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D.
555 C. M.; SENEDA, M. M. Antral follicle populations and embryo production--in vitro and
556 in vivo--of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction**
557 **in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 2, p. 228–232, 2014.
- 558
- 559 SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The Follicle-Stimulating Hormone
560 Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*.
561 **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 739–773, 1997.
- 562
- 563 SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.;
564 RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth
565 factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and
566 progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows.
567 **Journal of reproduction and fertility**, v. 102, n. 2, p. 483–492, 1994.
- 568
- 569 SMITH, P.; WILHELM, D.; RODGERS, R. J. Development of mammalian ovary.
570 **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, p. 145–161, 2014.
- 571
- 572 STAMATIADES, G. A.; KAISER, U. B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH:
573 Signaling and gene expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 463, p.
574 131–141, 2018.
- 575
- 576 TARU SHARMA, G.; DUBEY, P.; SAI KUMAR, G. Localization and Expression of
577 Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral
578 Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 114–120, 2011.
- 579
- 580 TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J. E. Suppression of the secondary FSH surge with
581 bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in
582 heifers. **Reproduction**, v. 89, n. 2, p. 643–653, 1990.

- 583 UJU, C. N.; UNNIAPPAN, S. Growth factors and female reproduction in vertebrates.
584 **Molecular and cellular endocrinology**, vol. 579, 2024
585
- 586 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
587 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p.
588 1717–1751, 2005.
589
- 590 WEBB, R.; CAMPBELL, B. K. Development of the dominant follicle: mechanisms of
591 selection and maintenance of oocyte quality. **Society of Reproduction and Fertility**
592 **supplement**, v. 64, p. 141–163, 2007.
593
- 594 WEBB, R.; GONG, J. G.; LAW, A. S.; RUSBRIDGE, S. M. Control of ovarian function
595 in cattle. **Proceedings of the British Society of Animal Science**, v. 1995, p. 6–6,
596 1995.
597
- 598 XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.;
599 YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing
600 hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first
601 follicular wave. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951–957, 1995.
602

603 **4 HIPÓTESE**

604

605 Vacas *Bos indicus* com baixa CFA possuem uma maior
606 imunexpressão de receptores das gonadotrofinas (FSH e LH) em seus folículos
607 ovarianos em comparação às de alta CFA.

608

609 **5 OBJETIVO**

610

611 **5.1 Objetivo geral**

612

613 Avaliar as diferenças na intensidade de imunomarcção de receptores
614 de FSH e LH nos folículos ovarianos de vacas *Bos indicus* de baixa e alta contagem
615 de folículos antrais (CFA).

616

617 **5.2 Objetivos específicos**

618

- 619 • Comparar a imunomarcção de receptores de FSH e LH nos folículos
620 ovarianos de vacas de alta e baixa CFA;
- 621 • Avaliar a intensidade de imunomarcção de receptores de FSH e LH em
622 folículos pré-antrais e antrais de alta e baixa CFA;
- 623 • Avaliar a imunomarcção de receptores de FSH e LH nas células da granulosa
624 e da teca de folículos antrais de animais de alta e baixa CFA.

625 **6 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

626 **IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES GONADOTRÓFICOS EM FOLÍCULOS**
627 **OVARIANOS DE FÊMEAS *Bos indicus* DE ALTA E BAIXA CONTAGEM DE**
628 **FOLÍCULOS ANTRAIS**
629 ***IMMUNOSTAINING OF GONADOTROPIN RECEPTORS OF *Bos indicus* COWS WITH***
630 ***HIGH AND LOW ANTRAL FOLLICLE COUNT***

631

632 Deborah Nakayama Yokomizo¹, Mariana Moreira dos Anjos¹, Ana Karolyne Alves
633 Miguel¹, Fábio Morotti¹, Marcelo Marcondes Seneda¹

634

635 ¹Laboratório da Biotecnologia da Reprodução Animal, Departamento de Medicina Veterinária,
636 Universidade Estadual de Londrina.

637

638

RESUMO

639

640 O objetivo desse estudo foi avaliar a diferença de intensidade da imunomarcação de
641 receptores de FSH (FSHr) e LH (LHr) nos folículos ovarianos de vacas *Bos indicus* de
642 alta e baixa contagem de folículos antrais (CFA). Os ovários (n = 40) de vacas Nelore
643 cíclicas foram obtidos em frigorífico local, e logo após foi realizada a classificação da
644 CFA (≥ 3 mm) e em grupos de alta CFA (≥ 30 folículos antrais, n=10) ou baixa CFA
645 (≤ 15 folículos antrais, n=10). A preparação histológica seguiu protocolo padrão.
646 Posteriormente, realizou-se a imuno-histoquímica para receptores de FSH e de LH. A
647 análise da intensidade de imunomarcação foi realizada por meio do software Image J
648 com a extensão IHC profiler nos folículos pré-antrais (folículo primordial, primário e
649 secundário) e folículos antrais. A intensidade de imunomarcação foi medida através
650 da intensidade de pixel, escala de zero a 255, sendo zero a tonalidade mais escura e
651 255, a mais clara. Para a análise estatística foi através da ANOVA com efeito misto
652 ajustado e o teste de Tukey como teste de média post hoc, e considerado significativo
653 quando $P \leq 0,05$. Todas as categorias de desenvolvimento folicular foram
654 imunomarcadas. A intensidade de imunomarcação para FSHr teve interação entre o
655 grupo CFA e o estágio de desenvolvimento folicular, em que os folículos pré-antrais
656 de baixa CFA apresentaram uma maior intensidade de imunomarcação ($120,74 \pm 2,20$
657 vs $139,46 \pm 1,74$, $P = 0,026$). A intensidade de imunomarcação para receptor de FSH
658 dos folículos antrais do grupo de baixa CFA foi maior em relação ao grupo de alta CFA
659 ($135,69 \pm 2,88$ vs $152,38 \pm 2,27$, $P = 0,032$). Houve uma maior intensidade de
660 imunomarcação para LHr de vacas do grupo de baixa CFA em relação ao grupo de
661 alta CFA ($115,54 \pm 1,72$ vs $129,38 \pm 1,40$, $P = 0,05$). Em resumo, os folículos ovarianos
662 de vacas *Bos indicus* de baixa CFA exibiram uma maior intensidade de
663 imunomarcação dos receptores de FSH e LH.

664

665 **Palavras-chave:** desenvolvimento folicular; receptor de FSH; receptor de LH;
666 bovinos; imunomarcação.

667

668

ABSTRACT

669

670 This study aimed to assess the difference in intensity of immunostaining of FSH (FSHr)
671 and LH (LHr) receptors in ovarian follicles of *Bos indicus* cows with high and low antral
672 follicle count (AFC). Ovaries (n=40) from cyclic Nelore cows were collected from a local
673 abattoir, AFC classification (≥ 3 mm) was performed, and the high (≥ 30 antral follicles,
674 n=10) and low (≤ 15 antral follicles, n=10) AFC groups were separated. Histological
675 preparation followed a standard protocol. Subsequently, immunohistochemistry for
676 FSH and LH receptors was conducted. The analysis of immunostaining intensity was
677 performed using Image J software with the IHC profiler extension in pre-antral follicles
678 (primordial, primary, and secondary follicles) and antral follicles. Immunostaining
679 intensity was measured using pixel intensity, ranging from zero to 255, where zero
680 represented the darkest shade and 255 the lightest. Statistical analysis was conducted
681 using mixed-effects ANOVA and Tukey's test as a post hoc mean test, with significance
682 set at $P \leq 0.05$. All follicular development categories were immunolabeled. The
683 immunostaining intensity for FSHr showed an interaction between the AFC group and
684 follicular developmental stage, with low AFC pre-antral follicles exhibiting higher
685 immunostaining intensity (120.74 ± 2.20 vs 139.46 ± 1.74 , $P = 0.026$). The
686 immunostaining intensity for FSH receptors in antral follicles of the low AFC group was
687 higher compared to the high AFC group (135.69 ± 2.88 vs 152.38 ± 2.27 , $P = 0.032$).
688 There was a higher immunostaining intensity for LHr in cows from the low AFC group
689 compared to the high AFC group (115.54 ± 1.72 vs 129.38 ± 1.40 , $P = 0.05$). In
690 summary, ovarian follicles of *Bos indicus* cows with low AFC exhibited higher
691 immunostaining intensity of FSH and LH receptors.

692

693 **Keywords:** follicular development; FSH; LH; cattle; immunostaining.

694

INTRODUÇÃO

696

697 Fêmeas taurinas de baixa CFA são frequentemente associadas com
698 baixa fertilidade (IRELAND, et al., 2007; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; MOSSA et
699 al., 2012). Por outro lado, estudos demonstraram uma melhor performance em fêmeas
700 zebuínas de baixa CFA comparação a alta CFA, quando aplicado a inseminação
701 artificial em tempo fixo (SANTOS et al., 2016). A melhor taxa de concepção está
702 associada a um maior folículo dominante em animais Nelore (diâmetro folicular no
703 momento da IATF de fêmeas que ficaram gestantes $13,33 \pm 2,40$ mm VS $11,27 \pm$
704 $2,75$ mm não gestantes) (RIBEIRO FILHO et al., 2013). Do mesmo modo, muitos
705 estudos identificaram um maior diâmetro folicular em vacas Nelore classificadas em

706 baixa CFA em comparação as de alta CFA (MOROTTI et al., 2018; DE LIMA et al.,
707 2020; MOROTTI et al., 2022). Além de uma maior concentração de FSH circulante e
708 produção de estrógeno em fêmeas *Bos taurus* de baixa CFA (BURNS et al., 2005;
709 IRELAND et al., 2009).

710 O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH)
711 são as principais gonadotrofinas envolvidas nas funções reprodutivas de mamíferos e
712 a sua ação conjunta é importante para o desenvolvimento folicular normal e a
713 esteroidogênese (LEVI-SETTI et al., 2004; KADOKAWA et al., 2014; STAMATIADES;
714 KAISER, 2018). As gonadotrofinas atuam por meio de receptores de membrana
715 específicos acoplados a proteína G, e a ligação de FSH ou LH aciona uma cascata de
716 fosforilação de proteínas quinases, regulando diversas funções celulares (SARAIVA
717 et al., 2010).

718 O FSH possui importância principalmente no início do
719 desenvolvimento folicular (ADAMS et al., 1992), na indução da expressão de
720 receptores, como do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) e do
721 receptor de LH, e a indução da formação do antro (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005;
722 HUNZICKER-DUNN; MAIZELS, 2006; SARAIVA et al., 2010). Já o LH está envolvido
723 com o desvio e manutenção da dominância folicular, visto que folículos dominantes
724 são menos dependentes ao FSH (ADAMS et al., 1992; XU et al., 1995).

725 Devido à escassez de estudos a respeito da expressão de receptores
726 gonadotróficos entre as vacas de baixa e alta CFA, o objetivo deste estudo foi avaliar
727 a diferença na intensidade de imunomarcagem de receptores de FSH e LH nos
728 folículos ovarianos de vacas Nelore (*Bos indicus*) de baixa e alta contagem de folículos
729 antrais.

730

731 MATERIAL E MÉTODOS

732

733 Os ovários utilizados neste experimento foram provenientes de animais
734 abatidos de acordo com as normas estabelecidas pela Lei n. 1.283 de 18 de dezembro
735 de 1950.

736

737 *Obtenção de amostras*

738

739 Para a realização do estudo foram coletados, de um frigorífico
740 localizado em latitude -23.405279763088323° N e longitude -51.431028589568086°
741 W (tempo médio de 30 minutos), ovários de vinte vacas cíclicas (presença de corpo
742 lúteo – CL) *Bos indicus* da raça Nelore, separados por pares e transportados, em caixa
743 térmica refrigerada a 4°C, até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (ReproA
744 – UEL).

745

746 *Classificação da contagem de folículos antrais*

747

748 Anterior ao processamento histológico, foi realizada a classificação da
749 CFA, estabelecida a partir da contagem dos folículos antrais (≥ 3 mm) visíveis na
750 superfície dos ovários, por um único operador treinado, mediante utilização de
751 paquímetro (CUSHMAN et al., 2009; ROSA et al., 2018) e os grupos identificados em
752 baixa CFA com ≤ 15 folículos antrais (n=10) e alta CFA com ≥ 30 folículos antrais
753 (n=10), classificação adaptada de Morotti e colaboradores (2022). Os ovários de vacas
754 com CFA intermediária foram descartados do estudo.

755

756 *Preparação histológica*

757

758 Imediatamente após a classificação da CFA, o ovário contralateral ao
759 corpo lúteo de cada animal foi seccionado longitudinalmente e fragmentos
760 transversais (2x1x1x cm) foram fixados em formol por 24 horas, e em seguida
761 armazenados em álcool 70%. Para o processamento histológico, as amostras
762 passaram pela desidratação em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol,
763 embebedadas e incluídas em parafina para a formação de blocos histológicos, que
764 foram cortados para a confecção das lâminas em espessura de 4 μ m utilizando
765 micrótomo automático (HM 335S, Thermo Scientific).

766

767 *Imuno-histoquímica*

768

769 Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas de
770 animais de alta e baixa contagem de folículos antrais (CFA) foram sujeitas às mesmas
771 condições do protocolo de imuno-histoquímica.

772 As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em soluções
773 decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%). Em seguida foram incubadas em
774 tampão citrato (pH 6,0) para a recuperação antigênica em panela de pressão elétrica
775 por 12 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueado com diluição de 1:1 de água
776 destilada e peróxido de hidrogênio (6%) por 30 minutos em câmara escura e as
777 reações inespecíficas bloqueadas com leite em pó desnatado (5%) por 10 (FSHr) e
778 15 (LHr) minutos. Para a imunolocalização de receptores de FSH e LH, as lâminas
779 foram incubadas utilizando anticorpo primário anti-FSHr (diluição 1:300, ab113421,
780 *Abcam*) e anticorpo primário anti-LHr (diluição 1:100, ab125214, *Abcam*),
781 respectivamente, por 22 horas a 4°C em câmara úmida. As lâminas então foram
782 incubadas com anticorpo secundário (diluição 1:1000, ab205718, *Abcam*) por uma
783 hora, e a revelação da marcação com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, ab64238, *Abcam*)
784 e contra coradas com hematoxilina. As lâminas foram montadas com meio de
785 montagem Entellan. O controle negativo foi realizado com a substituição do anticorpo
786 primário por solução tampão fosfato salino (PBS) em cada protocolo.

787

788 *Análise das imagens*

789

790 Para a análise, as imagens de todos os folículos imunocorados das
791 lâminas foram digitalizadas sob a mesma intensidade de luz pela objetiva de 40 X por
792 meio do microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) conectado a
793 câmera HiperCam 5MP e utilizando o software AmScope (v. 4.11.19627.20210925).
794 As imagens foram salvas com resolução de 2.560 x 1.920 pixels no formato .tif, e
795 posteriormente analisadas através do software Image J (ImageJ 1,54g, *National*
796 *Institutes of Health*, Maryland, U.S.A.).

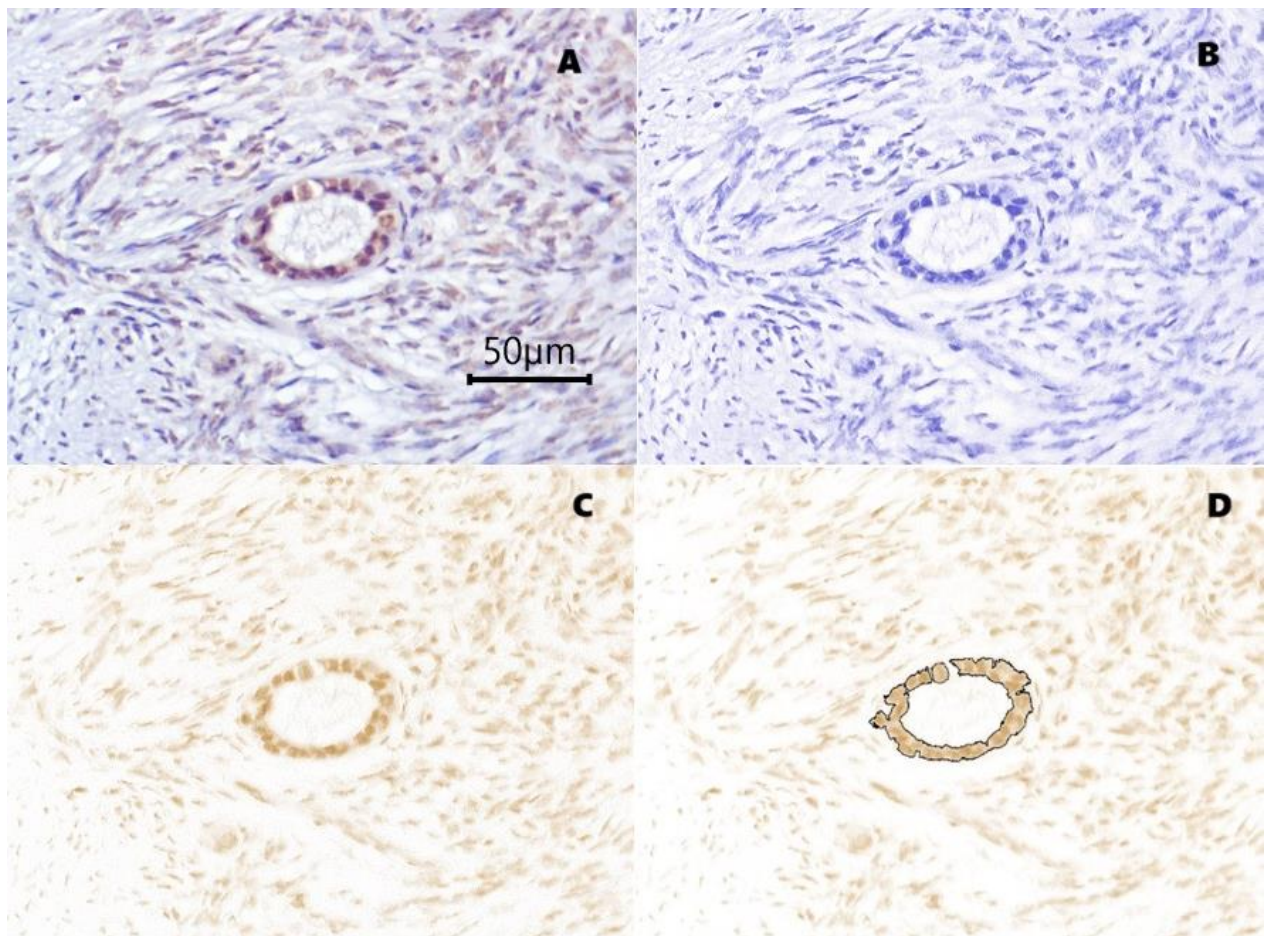
797

798 As imagens foram analisadas pelo software Image J utilizando a
799 extensão *IHC profiler* que permite a separação dos canais de cor utilizando os vetores
800 HDAB, resultando em três imagens, uma com a imagem original, uma com apenas a
801 coloração da hematoxilina e a outra com a coloração do DAB (Figura 1). Na imagem
802 com apenas a coloração do DAB, a região de interesse de cada folículo foi delimitada
803 a partir da opção *Threshold (Image -> Adjust -> Threshold)*, a região de interesse foi
804 selecionada utilizando a ferramenta *Brush* e a intensidade da coloração DAB
mensurada (VARGHESE et al., 2014). A mensuração da intensidade da

805 imunomarcção de DAB de folículos antrais foi dividida em duas regiões: células da
806 granulosa (CG) e células da teca (CT); para cada região, 5 áreas aleatórias de
807 imunomarcção foram mensuradas e a intensidade média considerada. Os valores de
808 intensidade de pixel variam de 0 a 255, em que 0 representa a cor mais escura e 255
809 a tonalidade de cor mais clara (Figura 2; FUHRICH; LESSEY; SAVARIS, 2013;
810 VARGHESE et al., 2014). Para avaliar a precisão da aplicação da extensão IHC
811 *profiler* para a separação dos canais de cor, a imagem de um folículo ovariano do
812 controle negativo foi utilizada para a análise (Figura 3).

813

814 **Figura 1** – Análise de folículo ovariano bovino, imunomarcado para receptor de FSH
815 por meio do *software* Image J. A: Imagem original submetida a extensão *IHC profiler*;
816 B: Imagem da coloração de hematoxilina, após a separação os canais de cor; C:
817 Imagem da marcação do DAB; D: Imagem representando a região de interesse
818 delimitada para a mensuração da intensidade da imunomarcção do DAB. Aumento
819 de 40 x; escala de 50 μm .

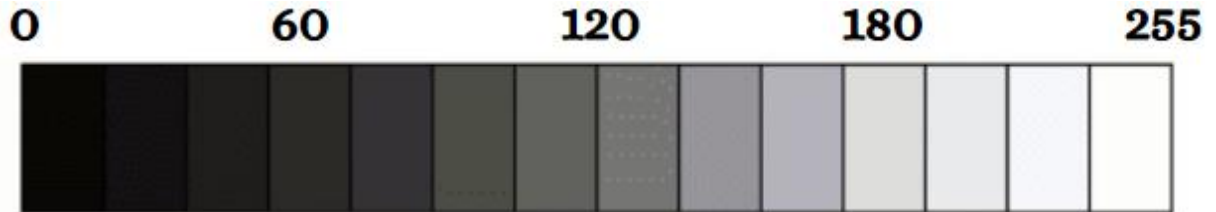


820

821

822

823 **Figura 2** – Escala de intensidade de pixel separada por intervalos de intensidade de
824 acordo com o que foi proposto por Fuhrich; Lessey e Savaris (2013).



825

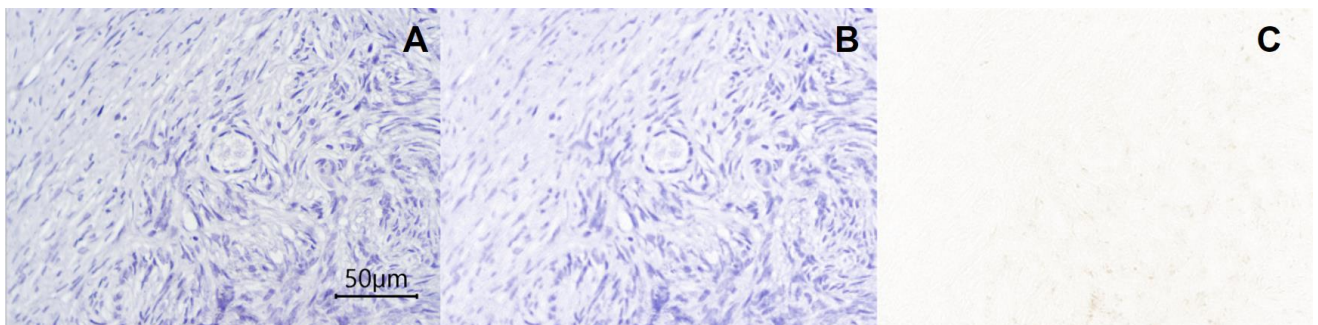
826

827

828

829

830 **Figura 3** – Análise de folículo ovariano bovino do controle negativo submetido ao
831 software Image J com a extensão IHC *profiler*. A: Imagem original do controle
832 negativo; B: Imagem com a coloração da hematoxilina; C: Imagem com a coloração
833 do DAB. Aumento de 40 x; escala de 50 μ m.



834

835

836 *Classificação de folículos*

837

838 Os folículos foram classificados em pré-antrais, que inclui o folículo
839 primordial (oócito envolto por uma camada de células da granulosa achatadas),
840 folículo primário (oócito envolto por uma cama de células da granulosa cúbicas) e
841 folículo secundário (oócito envolto por mais de uma camada de células da granulosa
842 cúbicas) e folículos antrais (folículo ovariano com a formação do antro folicular)
843 (FIGUEIREDO, et al., 2011; FIGUEIREDO, et al., 2019).

844

845

846

847 *Análise estatística*

848

849 A intensidade média de imunomarcção para receptores de FSH e LH
850 foram analisados por ANOVA empregando modelo de efeito misto ajustado. O grupo
851 de CFA (Baixa e Alta) e o estágio de desenvolvimento folicular (Antral e Pré-antral)
852 foram considerados fatores fixos do modelo. Os animais foram considerados fatores
853 aleatórios e o número de folículos antrais foi considerado como covariável. Na
854 presença de efeito significativo, empregou-se teste de Tukey como teste de média
855 post hoc. A frequência de distribuição entre os grupos foi analisada pelo teste exato
856 de Fisher através de comparação 2x2. Para análise descritiva, os dados estão
857 apresentados em média e erro padrão da média ou como porcentagem. Todas as
858 análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab® 18, adotando
859 nível de significância quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P < 0,1$.

860

861 **RESULTADOS**

862

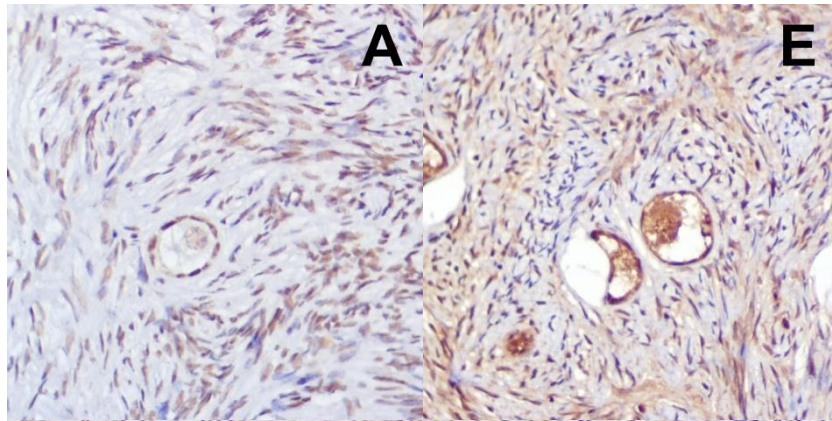
863 A CFA de animais do grupo de baixa foi de $9,56 \pm 0,16$, enquanto para
864 alta CFA foi de $44,04 \pm 0,49$. O número total de folículos imunomarcados analisados
865 para receptor de FSH foi de 588 folículos, sendo 312 para baixa CFA e 276 para alta
866 CFA. Já para o receptor de LH, foram analisados 741 folículos, sendo 359 para baixa
867 CFA e 382 para alta CFA.

868 Independente da classificação de CFA (baixa ou alta), todas as
869 categorias de desenvolvimento dos folículos pré-antrais (folículo primordial, primário
870 e secundário) e folículo antral foram imunomarcados tanto para receptor de FSH
871 quanto para LH (Figura 3). Eventualmente, o núcleo das células da granulosa e da
872 teca apresentavam imunomarcções, assim como o citoplasma e núcleo do oócitos.

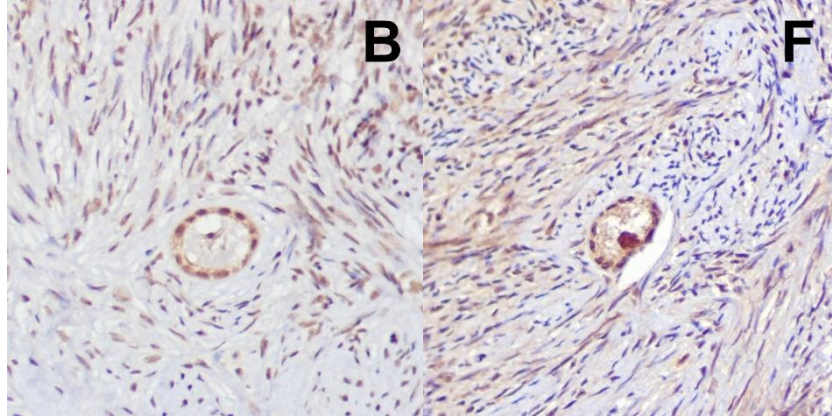
873

874 **Figura 4** – Imunomarcção para receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) nas
875 imagens A-D, e para receptor de hormônio luteinizante (LHr) nas imagens E-H.
876 Aumento de 40 x; escala = 50 μm .

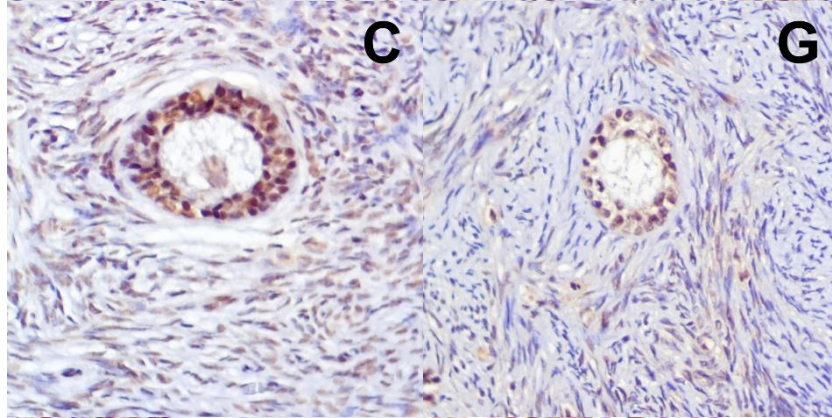
877



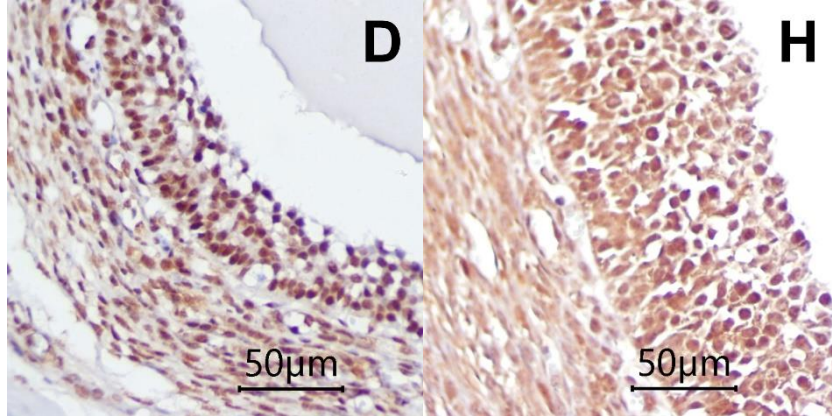
878



879



880



881

A, D: Folículo primordial; B, E: Folículo primário; C, F: Folículo secundário; D, H: Folículo antral.

882

883

884 *Avaliação da intensidade de imunomarcção para receptor de FSH*

885

886

887

888

889

890

891 **Tabela 1** – Efeito da contagem de folículos antrais (CFA) e estágio de
892 desenvolvimento folicular na imunomarcção de receptores de FSH e de LH.

	Fatores	Intensidade FSHr (M ± EP)	Intensidade LHr (M ± EP)
	Alta	144,33 ± 1,43	129,38 ± 1,40 ^a
Grupo CFA	Baixa	124,06 ± 1,85	115,54 ± 1,72 ^b
	Valor de p	0,320	0,05
Estágio de desenvolvimento	Pré-antral	128,64 ± 1,53 ^b	117,30 ± 1,24 ^b
	Antral	146,15 ± 1,89 ^a	144,23 ± 1,90 ^a
	Valor de P	0,03	< 0,0001

893

^{a-b} indica diferença (p<0,05) entre o grupo CFA e o estágio de desenvolvimento folicular.

894

895

896

897

898

899 **Tabela 2** – Efeito da interação entre contagem de folículos antrais (CFA) e estágio de
900 desenvolvimento folicular sobre a intensidade média de imunomarcção para
901 receptores de FSH.

Interação	Intensidade FSHr (M ± EP)
Alta CFA*antral	152,38 ± 2,27 a
Alta CFA*pré-antral	139,46 ± 1,74 b
Baixa CFA*antral	135,69 ± 2,88 b

Baixa CFA*pré-antral	120,74 ± 2,20 c
Valor de P	0,026

902 ^{a-c} indica diferença (p<0,05) entre os grupos de interação (CFA*desenvolvimento folicular).
903

904 Considerando a análise apenas em folículos antrais, a intensidade de
905 imunomarcacão para receptores de FSH foi influenciada pelo grupo de CFA (p =
906 0,032) e pela região (p = 0,002), sendo a região CG (141,54 ± 2,72) com maior
907 intensidade em relação a região CT (150,76 ± 2,54). No entanto, não houve interação
908 entre grupo de CFA e a região analisada (p = 0,480).

909

910 *Avaliação da intensidade de imunomarcacão para receptor de LH*

911

912 A intensidade de imunomarcacão para receptores de LH foi influenciado pelo
913 grupo de CFA (p = 0,05; Tabela 1) e pelo estágio de desenvolvimento folicular (p <
914 0,0001). No entanto, nenhuma interação significativa foi observada para grupo de
915 CFA*estágio de desenvolvimento (p = 0,538).

916

917 Para a análise de folículos antrais, a imunomarcacão para receptor de
918 LH não houve influência do grupo de CFA (p = 0,203), embora a região determinou
919 um efeito (p = 0,035), sendo mais intenso em CG (140,34 ± 2,74) em relação a CT
(146,70 ± 2,72). Não houve interação entre grupo de CFA e a região (p = 0,789)

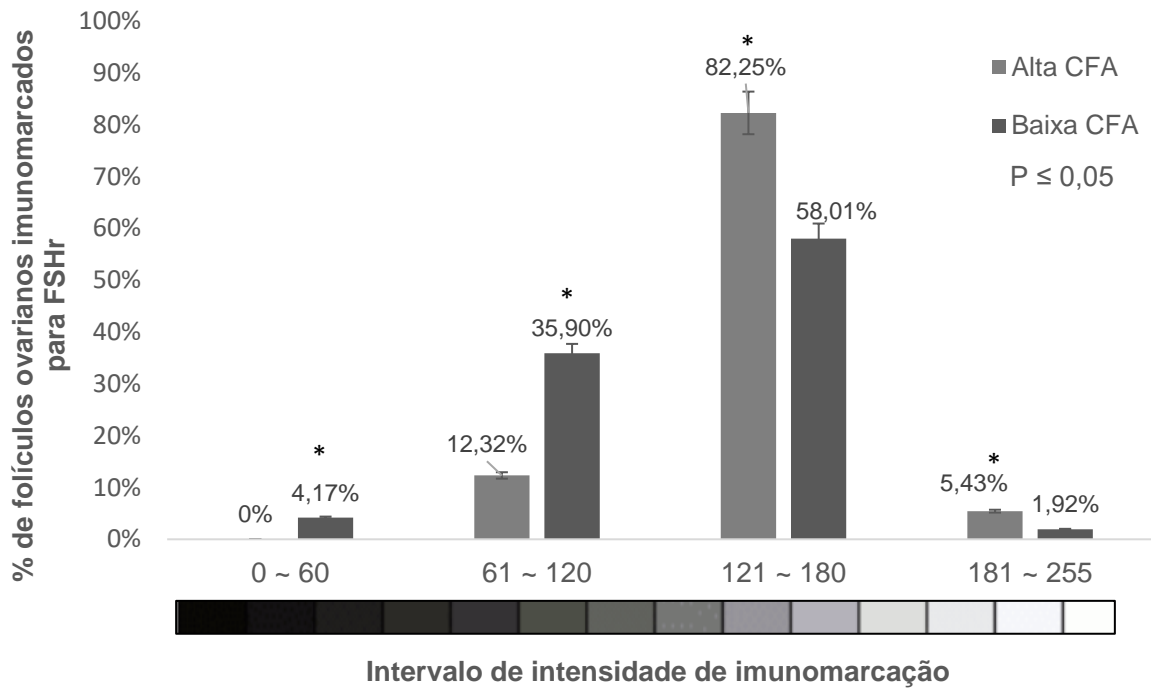
920

921 A frequência para intensidade de imunomarcacão dos receptores de
922 FSH e LH em folículos de vacas com baixa (9,56 ± 0,16) e alta (44,04 ± 0,49) CFA
923 estão representados na Figura 5 e 6. Para a melhor análise, a intensidade de pixel (0
924 a 255) está demonstrada em intervalos de intensidade. Animais de baixa CFA tanto
925 na imunomarcacão para FSHr quanto para LHR apresentaram uma maior frequência
926 nas imunomarcacões de maior intensidade.

926

927 **Figura 5** – Frequência dos intervalos de intensidade de imunomarcacão para FSHr e
928 LHR em folículos ovarianos de animais de alta e baixa CFA.

929



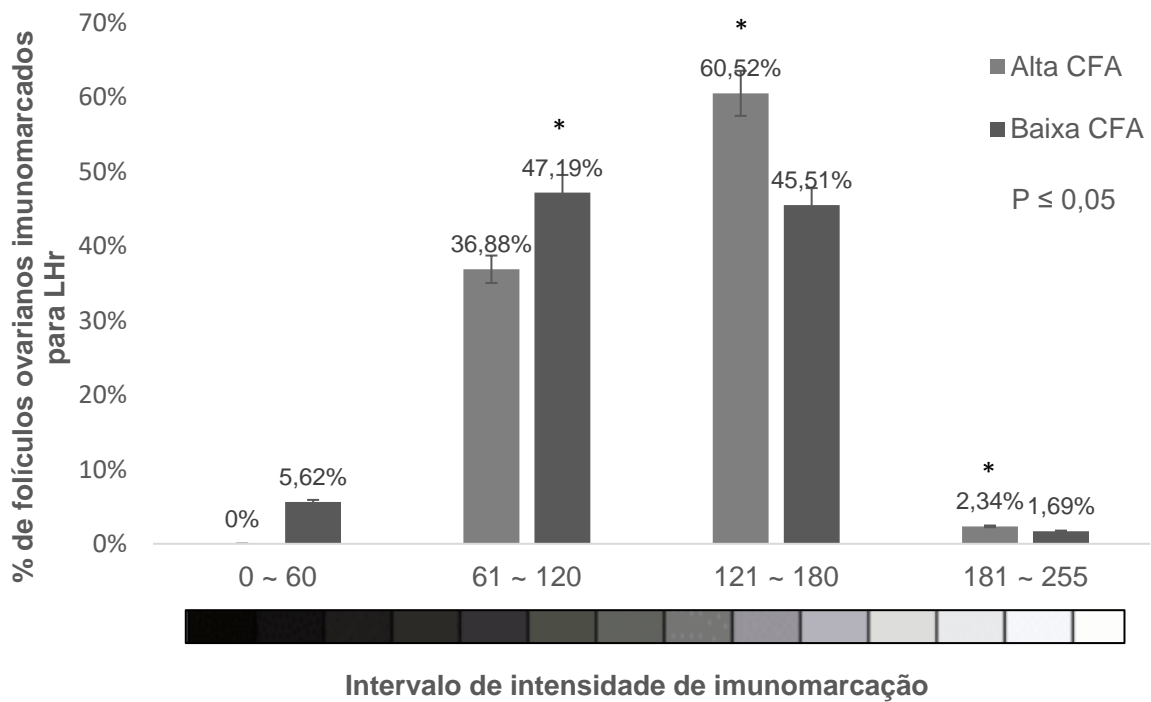
930

931 (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre os intervalos de intensidade de imunomarcção para FSHr entre os
 932 grupos de alta e baixa CFA.

933

934 **Figura 6** – Frequência dos intervalos de intensidade de imunomarcção para LHr em
 935 folículos ovarianos de animais de alta e baixa CFA.

936



937

938 (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre os intervalos de intensidade de imunomarcção para FSHr entre os
939 grupos de alta e baixa CFA.
940

941 **DISCUSSÃO**

942

943 De acordo com a literatura consultada, o presente estudo é o primeiro
944 a investigar a diferença na expressão de receptores gonadotróficos em fêmeas *Bos*
945 *indicus* de alta e baixa CFA. Os resultados demonstraram uma intensidade de
946 imunomarcção de receptores de LH (LHr) maior em animais de baixa CFA em
947 relação a de alta CFA. Além de uma maior intensidade de marcação de receptores de
948 FSH (FSHr) na interação do grupo de baixa CFA e folículos pré-antrais.

949 Ao avaliar a imunomarcção de LHr, os animais do grupo de baixa
950 CFA tiveram uma maior intensidade em relação ao grupo de alta CFA ($115,54 \pm 1,72$
951 $vs 129,38 \pm 1,40$; $P = 0,05$), ainda se observou marcação em todos os estágios de
952 desenvolvimento folicular (folículo pré-antral e folículo antral). Há relatos da presença
953 de receptores nas células da teca apenas a partir do aparecimento do antro, e um
954 aumento da expressão de LHr em células da granulosa no momento do desvio folicular
955 para posterior aquisição de dominância (BEG et al., 2001; ERENO et al., 2015). O LH
956 está envolvido não só na ovulação e luteinização, mas também tem papel importante
957 no desenvolvimento e competência do folículo, como na produção esteroidogênica
958 (LUO et al., 2011). A baixa expressão de receptor de LH e FSH está relacionada a
959 diminuição da produção dos esteroides (XU et al., 1995). Com isso, é possível que
960 animais da subespécie *Bos indicus* de baixa CFA possam ter uma melhor capacidade
961 de desenvolvimento folicular e maior produção de hormônios esteroides devido a
962 imunomarcção mais intensa presente nos folículos, indicando uma maior quantidade
963 de receptores presentes, melhorando a qualidade de oócitos e uma melhor fertilidade.

964 Ao avaliar os folículos antrais, não observou interação entre a CFA e
965 a intensidade de imunomarcção para LHr ($P = 0,203$). Contudo, a região das células
966 da granulosa demonstraram intensidade de imunomarcção maior em relação as
967 células da teca ($140,34 \pm 2,74 vs 146,70 \pm 2,72$, $P = 0,035$). Simões et al. (2012)
968 relatou um aumento na expressão gênica de LHr em células da granulosa com o
969 aumento do diâmetro folicular (10,1 a 11 mm, $p < 0,05$), mas o mesmo não ocorreu
970 em células da teca. No mesmo estudo, 90% da taxa de ovulação ocorreu em folículos
971 de maior diâmetro (>9 mm). Estudos relacionaram vacas zebus de baixa CFA com um

972 maior diâmetro folicular (MOROTTI et al., 2018; DE LIMA et al., 2020; MOROTTI et
973 al., 2022). Portanto, a maior presença dos receptores de LH nas células da granulosa
974 pode significar uma melhor resposta ao hormônio e assim desenvolvimento mais
975 eficiente do antro folicular.

976 Do mesmo modo para a imunomarcção de FSHr, os folículos antrais
977 do grupo de baixa CFA apresentaram maior intensidade em relação a de alta ($p =$
978 $0,032$). Podendo ter relação com a indução da formação do antro, devido ao FSH ser
979 um dos fatores responsáveis (RICHARDS et al., 2002; SARAIVA et al., 2010). Ao
980 analisar a intensidade dos folículos ovarianos, independente do estágio de
981 desenvolvimento, não encontramos efeito significativo entre o grupo de CFA.
982 Entretanto, houve interação entre CFA e estágio de desenvolvimento nos folículos pré-
983 antrais de fêmeas de baixa CFA ($p=0,026$). Em outros estudos, foi possível identificar
984 a presença de mRNA dos receptores de FSH em todos os estágios foliculares (ratas
985 (SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997), éguas (SCARLET et al., 2016), búfalas
986 (TARU SHARMA; DUBEY; SAI KUMAR, 2011). A presença de maior intensidade de
987 imunomarcção de FSHr desde os estágios iniciais de desenvolvimento, sugerem
988 uma maior ação da gonadotrofina e conseqüentemente, melhor desenvolvimento
989 folicular e maturação oocitária.

990 A presença ocasional de imunomarcção no núcleo das células da granulosa e
991 da teca, do citoplasma e núcleo do oócitos, também foi relatado por outros
992 pesquisadores, que demonstraram a presença dos receptores de FSH em oócitos de
993 porcas (MÉDURI et al., 2002) e em oócitos, células do cumulus, células da teca de
994 éguas (SCARLET et al., 2016), sugerindo efeito adicional dessa gonadotrofina em
995 outras células presentes no ovário.

996

997 **CONCLUSÃO**

998

999 Os folículos ovarianos de animais de baixa CFA apresentaram uma
1000 maior intensidade de imunomarcção para os receptores de LH. A intensidade de
1001 imunomarcção para FSHr de folículos pré-antrais de baixa CFA foi maior em relação
1002 aos folículos pré-antrais de alta CFA. Animais do grupo de baixa CFA apresentaram
1003 uma maior frequência dos intervalos de imunomarcção mais intensos tanto para
1004 FSHr quanto para LHr em relação aos animais de alta CFA.

1005 **REFERÊNCIAS**

1006

1007 ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J.
 1008 Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of
 1009 follicular waves in heifers. **Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 177–188, 1992

1010

1011 BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J.
 1012 Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle
 1013 deviation in cattle. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 432–441, 2001.

1014

1015 BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.;
 1016 IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence
 1017 for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an
 1018 inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology
 1019 of reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54–62, 2005.

1020

1021 CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.;
 1022 FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in
 1023 crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age,
 1024 and birth weight^{1,2}. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 1971–1980, 2009.

1025

1026 DE LIMA, M. A.; MOROTTI, F.; BAYEUX, B. M.; DE REZENDE, R. G.; BOTIGELLI,
 1027 R. C.; DE BEM, T. H. C.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; MEIRELLES, F. V.;
 1028 BARUSELLI, P. S.; DA SILVEIRA, J. C.; PERECIN, F.; SENEDA, M. M. Ovarian
 1029 follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional
 1030 patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. **Scientific
 1031 Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

1032

1033 ERENO, R. L.; LOUREIRO, B.; CASTILHO, A. C. S.; MACHADO, M. F.; PEGORER,
 1034 M. F.; SATRAPA, R. A.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, J.; BARROS, C. M.
 1035 Expression of mRNA Encoding the LH Receptor (LHR) and LHR Binding Protein in
 1036 Granulosa Cells from Nelore (*Bos indicus*) Heifers Around Follicle Deviation.
 1037 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 952–957, 2015.

1038

1039 FIGUEIREDO, J. R.; CADENAS, J.; LIMA, L. F. de; SANTOS, R. R. Advances in in
 1040 vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 52,
 1041 2019.

1042

1043 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.
 1044 Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. **23.**, 2011.
 1045 **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 40–47, 2011.

1046

1047 FUHRICH, D. G.; LESSEY, B. A.; SAVARIS, R. F. Comparison of HSCORE
 1048 Assessment of Endometrial $\beta 3$ Integrin Subunit Expression with Digital HSCORE
 1049 Using Computerized Image Analysis (ImageJ). **Analytical and quantitative
 1050 cytopathology and histopathology**, v. 35, n. 4, p. 210, 2013.

1051

- 1052 HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature
1053 granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein
1054 kinase A. **Cellular Signaling**, v. 18, n. 9, p. 1351, 2006.
1055
- 1056 IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.
1057 W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within
1058 individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the
1059 proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human**
1060 **reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 6, p. 1687–1695, 2007.
1061
- 1062 IRELAND, J. J.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.;
1063 BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH,
1064 G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to
1065 alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular
1066 differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 5, p.
1067 954–964, 2009.
1068
- 1069 JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; HOU,
1070 X.; DAVIS, J. S.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that
1071 high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on
1072 the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of**
1073 **reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1272–1281, 2009.
1074
- 1075 KADOKAWA, H.; PANDEY, K.; NAHAR, A.; NAKAMURA, U.; RUDOLF, F. O.
1076 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors of cattle aggregate on the
1077 surface of gonadotrophs and are increased by elevated GnRH concentrations.
1078 **Animal reproduction science**, v. 150, n. 3–4, p. 84–95, 2014.
1079
- 1080 LEVI-SETTI, P. E.; CAVAGNA, M.; BAGGIANI, A.; ZANNONI, E.; COLOMBO, G. V.;
1081 LIPRANDI, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. **European Journal of**
1082 **Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115, n. SUPPL., 2004.
1083
- 1084 LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILTBANK, M. C. The role of luteinizing
1085 hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in
1086 cattle. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 369–378, 2011.
1087
- 1088 MÉDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M.-A.; COMBETTES, L.; GRANET,
1089 P.; VANNIER, B.; LOOSFELT, H.; MILGROM, E. Follicle-Stimulating Hormone
1090 Receptors in Oocytes? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.
1091 87, n. 5, p. 2266–2276, 2002.
1092
- 1093 MOROTTI, F.; MIGUEZ-GONZALEZ, S.; CERZETTI, M. B.; SENEDA, M. M.
1094 Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the
1095 timed artificial insemination in cattle. **Animal reproduction**, v. 19, n. 1, 2022.
1096
- 1097 MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.;
1098 RAMOS CERQUEIRA, P. H.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and
1099 conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to
1100 timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 170–177,
1101 2018.

- 1102
1103 MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.;
1104 LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of
1105 ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows.
1106 **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2355–2361, 2012.
- 1107
1108 RIBEIRO FILHO, A. D. L.; FERRAZ, P. A.; RODRIGUES, A. S.; CALMON
1109 BITTENCOURT, T. C. B. D. S.; LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M. Diâmetro do
1110 folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em
1111 vacas nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 501–507, 2013.
- 1112
1113 RICHARDS, J. A. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.;
1114 FALENDER, A. E.; LO, Y. K.; SHARMA, S. C. Novel signaling pathways that control
1115 ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent progress in**
1116 **hormone research**, v. 57, p. 195–220, 2002.
- 1117
1118 ROSA, C.; MARINHO, L.; DA ROSA, P.; DE CESARO, M.; LUNARDELLI, P.; SILVA-
1119 SANTOS, K.; BASSO, A.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M. Molecular characteristics
1120 of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and
1121 high numbers of antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 4, p.
1122 921–929, 2018.
- 1123
1124 SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.;
1125 SANCHES, B. V.; DE MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High
1126 numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production
1127 but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal reproduction science**,
1128 v. 165, p. 17–21, 2016.
- 1129
1130 SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.;
1131 SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na
1132 foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 206–221,
1133 2010.
- 1134
1135 SCARLET, D.; WALTER, I.; HLAVATY, J.; AURICH, C. Expression and
1136 immunolocalization of follicle-stimulating hormone receptors in gonads of newborn
1137 and adult female horses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 9, p.
1138 1340–1348, 2016.
- 1139
1140 SIMÕES, R. A. L.; SATRAPA, R. A.; ROSA, F. S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.
1141 C. S.; ERENO, R. L.; TRINCA, L. A.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, J.; BARROS,
1142 C. M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of
1143 the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 139–147,
1144 2012.
- 1145
1146 SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The Follicle-Stimulating Hormone
1147 Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*.
1148 **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 739–773, 1997.
- 1149

- 1150 STAMATIADES, G. A.; KAISER, U. B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH:
1151 Signaling and gene expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 463, p.
1152 131–141, 2018.
1153
- 1154 TARU SHARMA, G.; DUBEY, P.; SAI KUMAR, G. Localization and Expression of
1155 Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral
1156 Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 114–120, 2011.
1157
- 1158 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
1159 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p.
1160 1717–1751, 2005.
1161
- 1162 VARGHESE, F.; BUKHARI, A. B.; MALHOTRA, R.; DE, A. IHC Profiler: An Open
1163 Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of
1164 Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p.
1165 e96801, 2014.
1166
- 1167 XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.;
1168 YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing
1169 hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first
1170 follicular wave. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951–957, 1995.
1171

1172 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1173

1174 De acordo com os resultados desse estudo foi possível observar que
1175 os folículos ovarianos de vacas *Bos indicus* de baixa CFA apresentaram uma maior
1176 presença de receptores de LH. No mais, em relação aos receptores de FSH em baixa
1177 CFA, os folículos pré-antrais apresentaram maior intensidade de imunomarcção.
1178 Essa informação demonstra uma das possíveis diferenças fisiológicas e de resposta
1179 de fêmeas *Bos indicus* dependendo da categoria de CFA.

1180 Os receptores gonadotróficos estavam presentes também no núcleo
1181 e citoplasma de oócitos, podendo ter um papel importante durante o desenvolvimento
1182 e maturação oocitária.