



CLARA EMMANUELLY MOTA MARTINS

**QUALIDADE E STATUS ANTIOXIDANTE DE OÓCITOS
RECUPERADOS DE DOADORAS *BOS TAURUS* X *BOS*
INDICUS COM ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS
ANTRAIS**

LAVRAS-MG

2025

CLARA EMMANUELLY MOTA MARTINS

**QUALIDADE E STATUS ANTIOXIDANTE DE OÓCITOS
RECUPERADOS DE DOADORAS *BOS TAURUS* X *BOS INDICUS* COM
ALTA E BAIXA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Prof. Dr. Nadja Gomes Alves

LAVRAS-MG

2025

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Martins, Clara Emmanuely Mota.

Qualidade e status antioxidante de oócitos recuperados de doadoras Bos Taurus x Bos Indicus com alta e baixa contagem de folículos antrais / Clara Emmanuely Mota Martins. - 2025.

90 p. : il.

Orientadora: Nadja Gomes Alves

Coorientador: Miller Pereira Palhão

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Contagem de folículos antrais em bovinos . 2. Estresse oxidativo em oócitos. 3. Sistema antioxidante na reprodução de vacas . I. Alves, Nadja Gomes. II. Palhão, Miller Pereira. III. Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

CLARA EMMANUELLY MOTA MARTINS

**QUALIDADE E STATUS ANTIOXIDANTE DE OÓCITOS RECUPERADOS DE
DOADORAS BOS TAURUS X BOS INDICUS COM ALTA E BAIXA CONTAGEM
DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

**QUALITY AND ANTIOXIDANT STATUS OF OOCYTES RECOVERED FROM BOS
TAURUS X BOS INDICUS DONORS WITH HIGH AND LOW ANTRAL FOLLICLE
COUNTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de junho de 2025.

Dra. Nadja Gomes Alves, DZO UFLA

Dr. Renato Ribeiro de Lima, DES/ICET UFLA

Dra. Barbara Azevedo Pereira Torres, DMV/FZMV UFLA

Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira, EMBRAPA Gado de Leite.

Dr. Bruno Campos de Carvalho, EMBRAPA Gado de Leite.

Orientadora

Prof. Dr. Nadja Gomes Alves

LAVRAS – MG

2025

A Deus, meu guia e protetor nessa jornada.
Aos meus pais, familiares e amigos que foram minha grande força.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido meu auxílio e força nos momentos de cansaço, tristeza, desânimo e medo. Por me fazer sentir capaz para que pudesse realizar essa trajetória e aprender com os erros e acertos, sem Ele nada teria sido possível.

Aos meus pais, Flávia das Mercês Mota e Sebastião Morélio Martins, por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditei, me ensinando a manter meus valores, virtudes e caráter.

Ao meu namorado Sávio Garcia, por ser tão companheiro, me amparar e incentivar a cada momento dessa jornada. Pela paciência e por acreditar em mim. Seu carinho e amor foram como bálsamo.

Aos meus irmãos, Pedro Martins, Diana Martins e Maria Eduarda Martins e aos meus sobrinhos, Maria Alice e Pedro Antônio, por compartilharem comigo as melhores histórias, me mostrando como é bom ser feliz com as pequenas coisas.

Aos meus amigos, Diego, Pâmela, Edilson, Adrian, Maiza e Maria Augusta, por todas os momentos felizes e risadas durante esses anos de amizade.

A professora e orientadora Nadja Gomes Alves por todo o aprendizado, crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia e Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFLA, pela oportunidade de realização do mestrado e por todo o suporte.

Aos membros da banca examinadora, professora Bárbara Azevedo Pereira Torres e aos professores José Camisão de Souza e Renato Ribeiro de Lima, e aos pesquisadores Bruno Campos de Carvalho, Luiz Gustavo Bruno Siqueira e Lucas Machado Figueira, por aceitarem o convite, pelo auxílio e colaboração com este trabalho.

Aos meus amigos, em especial os discentes de pós-graduação que me acompanharam por todo esse percurso: Cristiane Salatiel, José Nascimento Neto, Esther Abihail Fuentes, Lorena Lima, Letícia Faria e Brenda Dias.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial à EMBRAPA - Gado de Leite e aos seus colaboradores, pela disponibilidade da infraestrutura necessária para a condução da pesquisa.

Ao Laboratório Agropogen em especial ao João Pedro Campos, pela oportunidade de aprendizado e suporte.

Ao grupo de estudos NUTRAN, em especial às alunas de iniciação científica, Gabriela Ferreira e Ingrid Barreto, pelas amizades, oportunidades de aprendizado e troca de experiência.

Aos colaboradores do Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia, Antônio Lima e Stefânia Souza, e do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia, em especial ao professor Eduardo Alves, por todo o auxílio.

Ao professor, Luthesco Chalfun por ser um grande mentor desde a graduação e pelas várias oportunidades, como a participação no Núcleo de Estudo em Bovinocultura Leiteira NEBOL- UNILAVRAS, onde pude descobrir minha grande paixão pela bovinocultura.

À Universidade Federal de Lavras, aos Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias– PPGCV/UFLA por serem fundamentais em minha trajetória acadêmica. Agradeço pelo suporte, pela qualidade de ensino, pela infraestrutura de excelência e pelo ambiente que me proporcionaram, contribuindo de maneira decisiva para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo número APQ-144217) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

"Nada te perturbe, nada te espante. Tudo passa, Deus não muda. A paciência tudo alcança."

(Santa Teresa de Ávila)

RESUMO

A contagem de folículos antrais (CFA) tem sido associada à fertilidade de fêmeas e à qualidade oocitária, possivelmente relacionada ao status oxidativo. Entretanto, a relação entre CFA e status oxidativo dos oócitos é pouco compreendida. Neste estudo, objetivou-se avaliar a qualidade oocitária de vacas mestiças com alta e baixa CFA, com ênfase no status antioxidante. Foram utilizadas 26 vacas Holandês-Gir (1/2, 3/4, 5/8 e 7/8), lactantes, primíparas e múltiparas, com produção de $17,39 \pm 8,38$ kg de leite/dia e 108 ± 36 dias em lactação. Dentro dos grupamentos genéticos, as vacas foram classificadas como baixa (primeiro e segundo quartis) ou alta CFA (quarto quartil), excluindo-se o terceiro quartil. Posteriormente, foram agrupadas em G1 (1/2 e 5/8 HG: alta CFA, n=3; baixa CFA, n=6) e G2 (3/4 e 7/8 HG: alta CFA, n=5; baixa CFA, n=8). Os complexos *cumulus-oócito* (COCs) e o fluido folicular foram obtidos por *ovum pick up*, após sincronização de emergência da onda folicular. Os COCs viáveis (graus I e II) foram maturados *in vitro* por 22 a 24 h e desnudos para análises de maturação nuclear, apoptose, atividade mitocondrial e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS). No fluido folicular foram avaliadas as atividades de catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). Como esperado, animais de alta CFA apresentaram mais folículos antrais em relação aos de baixa: G1 ($26,80 \pm 3,61$ vs. $15,54 \pm 1,53$; $P < 0,01$) e G2 ($24,60 \pm 2,53$ vs. $11,40 \pm 1,04$; $P < 0,001$). O número de COCs recuperados foi superior no G1 comparado ao G2 ($7,56 \pm 1,19$ vs. $4,62 \pm 0,62$; $P < 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre G1 e G2 quanto à porcentagem de COCs viáveis ($65,33 \pm 5,56$ vs. $69,63 \pm 7,26$), taxas de maturação nuclear ($51,84 \pm 6,97$ vs. $52,51 \pm 7,08$) e apoptose ($48,36 \pm 10,26$ vs. $1,75 \pm 156,43$). Contudo, o percentual de COCs degenerados foi menor no G1 ($24,69 \pm 3,50$ vs. $36,80 \pm 4,55\%$, $P < 0,05$). A atividade mitocondrial foi maior em oócitos de vacas de baixa CFA em comparação às de alta no G1 ($19,55 \pm 6,17$ vs. $7,11 \pm 2,76$; $P < 0,05$), mas não diferiu no G2 ($16,92 \pm 5,44$ vs. $13,00 \pm 4,07$; $P > 0,05$). A produção de EROS foi superior em vacas de baixa CFA, tanto no G1 ($38,98 \pm 10,59$ vs. $5,03 \pm 1,67$) quanto no G2 ($26,52 \pm 8,19$ vs. $9,00 \pm 2,36$; $P < 0,001$). No fluido folicular, a atividade de GPx foi menor ($0,0185 \pm 0,0016$ vs. $0,0258 \pm 0,0018$ U/mg proteína/mL; $P < 0,05$) e da SOD tendeu a ser menor ($0,2001 \pm 0,01598$ vs. $0,2427 \pm 0,01582$ UI/mg proteína/mL; $P < 0,07$) no G1 em relação ao G2, mas não houve diferença ($P > 0,05$) entre vacas de alta ou baixa CFA. A atividade da catalase não diferiu ($P > 0,05$) entre grupamentos genéticos ou categorias de CFA. Conclui-se que a CFA não foi associada à qualidade morfológica dos COCs. Contudo, maior atividade mitocondrial e/ou produção de EROS sem aumento concomitante na atividade antioxidante do fluido folicular, sugere estresse oxidativo em oócitos de vacas de baixa CFA.

Palavras-chave: apoptose celular; enzimas antioxidantes; espécies reativas de oxigênio; fertilidade; oócito; vacas leiteiras.

ABSTRACT

Antral follicle count (AFC) has been associated with female fertility and oocyte quality, possibly related to oxidative status. However, the relationship between AFC and oocyte oxidative status is poorly understood. This study aimed to evaluate the oocyte quality of crossbred cows with high and low AFC, with emphasis on antioxidant status. Twenty-six lactating Holstein-Gir cows (1/2, 3/4, 5/8 and 7/8), primiparous and multiparous, with a milk production of 17.39 ± 8.38 kg/day and 108 ± 36 days in lactation, were used. Within the genetic groups, the cows were classified as low (first and second quartiles) or high AFC (fourth quartile), excluding the third quartile. Subsequently, they were grouped into G1 (1/2 and 5/8 HG: high CFA, n=3; low CFA, n=6) and G2 (3/4 and 7/8 HG: high CFA, n=5; low CFA, n=8). Cumulus-oocyte complexes (COCs) and follicular fluid were obtained by ovum pick-up after synchronization of follicular wave emergence. Viable COCs (grades I and II) were matured in vitro for 22 to 24 h and denuded for analyses of nuclear maturation, apoptosis, mitochondrial activity, and accumulation of reactive oxygen species (ROS). In the follicular fluid, catalase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) activities were evaluated. As expected, animals with high AFC presented more antral follicles compared to those with low: G1 (26.80 ± 3.61 vs. 15.54 ± 1.53 ; $P < 0.01$) and G2 (24.60 ± 2.53 vs. 11.40 ± 1.04 ; $P < 0.001$). The number of COCs recovered was higher in G1 compared to G2 (7.56 ± 1.19 vs. 4.62 ± 0.62 ; $P < 0.05$). There was no difference ($P > 0.05$) between G1 and G2 regarding the percentage of viable COCs (65.33 ± 5.56 vs. 69.63 ± 7.26), nuclear maturation rates (51.84 ± 6.97 vs. 52.51 ± 7.08) and apoptosis (48.36 ± 10.26 vs. 1.75 ± 156.43). However, the percentage of degenerated COCs was lower in G1 (24.69 ± 3.50 vs. $36.80 \pm 4.55\%$, $P < 0.05$). Mitochondrial activity was higher in oocytes from cows with low AFC compared to those with high AFC in G1 (19.55 ± 6.17 vs. 7.11 ± 2.76 ; $P < 0.05$), but did not differ in G2 (16.92 ± 5.44 vs. 13.00 ± 4.07 ; $P > 0.05$). ROS production was higher in cows with low AFC, both in G1 (38.98 ± 10.59 vs. 5.03 ± 1.67) and G2 (26.52 ± 8.19 vs. 9.00 ± 2.36 ; $P < 0.001$). In follicular fluid, GPx activity was lower (0.0185 ± 0.0016 vs. 0.0258 ± 0.0018 U/mg protein/mL; $P < 0.05$) and SOD activity tended to be lower (0.2001 ± 0.01598 vs. 0.2427 ± 0.01582 IU/mg protein/mL; $P < 0.07$) in G1 compared to G2, but there was no difference ($P > 0.05$) between cows with high or low AFC. Catalase activity did not differ ($P > 0.05$) between genetic groups or AFC categories. It is concluded that AFC was not associated with the morphological quality of COCs. However, increased mitochondrial activity and/or ROS production without a concomitant increase in the antioxidant activity of the follicular fluid suggests oxidative stress in oocytes from cows with low AFC.

Keywords: apoptosis, reactive oxygen species; antioxidant enzymes; fertility; oocyte; dairy cow.

INDICADORES DE IMPACTO

Os resultados desta dissertação apresentam impactos em potencial de natureza tecnológica, produtiva e ambiental, com aplicação direta no aprimoramento das biotecnologias da reprodução assistida em vacas leiteiras, especialmente em sistemas produtivos que utilizam vacas mestiças das raças Holandês e Gir. A identificação da relação entre a contagem de folículos antrais (CFA) e o status oxidativo dos oócitos possibilita a seleção mais precisa de doadoras com maior potencial reprodutivo, impactando positivamente na eficiência dos programas de produção *in vitro* de embriões, o que representa um avanço tecnológico e produtivo para criadores e técnicos da área. Esse impacto é direcionado, principalmente, para produtores de leite e criadores de rebanhos mestiços, que contribuem significativamente para a cadeia produtiva do leite nacional. Assim, o trabalho contribui com subsídios científicos e práticos para o desenvolvimento sustentável da pecuária leiteira, consolidando-se como uma pesquisa de relevância para o setor produtivo e acadêmico.

IMPACT INDICATORS

The results of this dissertation present potential impacts of a technological, productive, and environmental nature, with direct application in improving assisted reproductive biotechnologies in dairy cows, especially in production systems that use crossbred Holstein and Gir cows. Identifying the relationship between antral follicle count (AFC) and oocyte oxidative status allows for more precise selection of donor cows with greater reproductive potential, positively impacting the efficiency of *in vitro* embryo production programs. This represents a technological and productive advancement for breeders and technicians in the field. This impact is primarily directed towards milk producers and breeders of crossbred herds, who contribute significantly to the national milk production chain. Thus, this work contributes scientific and practical support for the sustainable development of dairy farming, consolidating itself as relevant research for the productive and academic sectors.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

PRIMEIRA PARTE

Figura 1. Mecanismo da peroxidação lipídica em membranas celulares..... 35

Figura 2. Ação das enzimas antioxidantes no controle do estresse oxidativo em bovinos..... 38

SEGUNDA PARTE

Figura 1. Cronograma de aspiração folicular (OPU) para coleta de complexos cumulus-oócitos e fluido folicular (FOL) de vacas dos grupos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG). As vacas foram distribuídas em dois grupos para OPU, de modo a garantir a presença de animais de todos os cruzamentos em cada dia de aspiração..... 83

Figura 2. Porcentagem de oócitos maturados e apoptóticos em vacas com alta e baixa contagem folicular antral nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG) 85

Figura 3. Imagens representativas de oócitos mostrando DNA corado em azul sob coloração DAPI. (A) oócito não maturado. (B) oócito maturado em que é possível observar o núcleo e o primeiro corpúsculo polar. 87

Figura 4. Oócitos apoptóticos e não apoptóticos observados após o ensaio de TUNEL em oócitos bovinos. (A) oócito não apoptótico. (B) oócito apoptótico em que o DNA foi corado em verde. 88

Figura 5. Oócitos sob coloração para identificação de atividade mitocondrial, expressa em unidades arbitrárias. (A) maior atividade mitocondrial (35,27 UA). (B) menor atividade mitocondrial (14,69 UA). 89

Figura 6. Oócitos sob coloração para identificação de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), expressa em unidades arbitrárias (UA). (A) maior produção de EROS (32,81 UA). (B) menor produção de EROS (9,46 UA). 90

Figura 7: Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase no fluido folicular de vacas com baixa e alta contagem de folículos antrais nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG). 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de folículos, número de complexos cumulus-oócito (COCs), número de COCs viáveis e porcentagem de COCs viáveis e degenerados recuperados de vacas com baixa e com alta contagem de folículos antrais nos grupamentos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG) 84

Tabela 2. Atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ambas expressas em unidades arbitrárias (UA), em oócitos de vacas com baixa e alta contagem folicular antral nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG) 86

LISTA DE SIGLAS

AMH	Hormônio anti-Mülleriano
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CFA	Contagem de folículos antrais
CIV	Cultivo <i>in-vitro</i>
COCs	Complexos <i>cumulus-oócito</i>
DAPI	Prolong Diamond 4'6-diamidino-2-fenilindol
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
ECC	Escore de condição corporal
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FF	Fluido folicular
FIV	Fertilização <i>in-vitro</i>
FSH	Hormônio foliculo estimulante
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-OEt	Éster etílico de glutathione
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões
ITU	Índice de temperatura e umidade
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in-vitro</i>

mtDNA	DNA mitocondrial
OPU	<i>ovum pick-up</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PIVE	Produção <i>in-vitro</i> de embriões
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TE	Transferência de embriões
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated
UA	Unidades arbitrárias
UFLA	Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES	20
2.2.	CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS	21
2.2.1.	CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E FERTILIDADE	22
2.2.2.	CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS, QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES	24
2.2.3.	CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E RESPOSTA À SUPEROVULAÇÃO	26
2.3.	VARIABILIDADE E REPETIBILIDADE DA CFA	27
2.4.	ATIVIDADE MITOCONDRIAL E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	30
2.5.	ESTRESSE OXIDATIVO	32
2.6.	SISTEMA ANTIOXIDANTE	36
2.7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41
	Segunda parte – Artigo	54
	Resumo	56
	Introdução	58
	Material e métodos	60
	Resultados	69
	Discussão	71
	Conclusão	75
	Referências	76

1. INTRODUÇÃO

A reprodução é um parâmetro importante, sendo responsável pela geração de animais para reposição no rebanho. Nos Estados Unidos, a subfertilidade é o principal motivo para o descarte de animais (Alward; Cockrum; Ealy, 2023). Dessa forma, a fertilidade passou a ser uma característica importante nos programas de melhoramento genético, no entanto, esse avanço tem ocorrido de forma lenta (Grala *et al.*, 2021). Perante os desafios dessa área, as biotecnologias da reprodução são importantes ferramentas que trouxeram uma grande revolução para a bovinocultura (Moore; Hasler, 2017).

A PIVE se tornou o procedimento de maior eficiência dentre as biotecnologias (Vasconcelos *et al.*, 2020), permitindo a multiplicação de animais de alto valor genético e potencial produtivo em menor intervalo de tempo (Seneda *et al.*, 2016). Porém, alguns fatores, como a contagem de folículos antrais (CFA), a idade e a raça da doadora, a fase do ciclo estral e a qualidade oocitária, podem interferir no sucesso da técnica, causando uma alta variabilidade na taxa de produção de embriões (Garcia *et al.*, 2020).

A CFA é um indicador da reserva folicular ovariana (Alward; Cockrum; Ealy, 2023). Pesquisas têm sido realizadas acerca da CFA com o objetivo de compreender melhor a influência da população folicular sobre a fertilidade das vacas e a eficiência das biotecnologias reprodutivas (Morotti *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016). O número de complexos *cumulus-oócitos* (COCs) viáveis aspirados por meio da técnica da OPU apresenta ampla variação entre os indivíduos, podendo representar um fator limitante para a PIVE. Contudo, esse número tende a ser constante na mesma vaca ao longo de suas ondas foliculares (Ireland *et al.*, 2008; Grala *et al.*, 2021). Assim, por meio de um único exame ultrassonográfico é possível realizar a avaliação da CFA, observando-se a presença de folículos com diâmetro ≥ 3 mm, o que permite a classificação dos animais nas categorias de baixa, intermediária ou alta CFA (Seneda *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2020).

Um fator que pode contribuir para a maior eficiência na PIVE é o *status* antioxidante dos oócitos, visto que os processos dessa técnica elevam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que precisam ser neutralizadas (Cetica *et al.*, 2001). As EROS são formadas como subprodutos durante o metabolismo respiratório celular e atuam como importantes moléculas sinalizadoras na reprodução, por exemplo, na

retomada da meiose, extrusão do primeiro corpúsculo e ruptura da parede folicular (Barros *et al.*, 2019). Contudo, em concentrações elevadas, quando a capacidade das células de neutralizar as EROS é ultrapassada, ocorre o estresse oxidativo, que pode comprometer a competência oocitária, causar inativação de enzimas, danos ao DNA e peroxidação lipídica da membrana celular. Para manter a homeostase oxidativa, os oócitos e o fluido folicular contam com moléculas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que atuam na remoção das EROS (Cetica *et al.*, 2001, Gupta *et al.*, 2011; Broi *et al.*, 2018; Şen; Kuran, 2018; Marei *et al.*, 2022).

Considerando que as EROS são produzidas principalmente pela cadeia transportadora de elétrons, outro importante parâmetro indicativo da qualidade oocitária é a atividade mitocondrial. As mitocôndrias se distribuem de forma variável no citoplasma, de acordo com o estágio de desenvolvimento do oócito, sendo essenciais para a maturação citoplasmática e nuclear, fertilização e desenvolvimento embrionário, por meio do fornecimento de ATP (Bavister; Squirrell, 2000). Assim, um número insuficiente de mitocôndrias, sua má distribuição, formando grandes aglomerados, ou sua disfunção podem comprometer severamente a maturação oocitária (Roth, 2018).

A relação entre a CFA, o status antioxidante e a qualidade oocitária ainda é pouco compreendida. Nagai *et al.* (2016) observaram que oócitos de vacas com alta CFA apresentaram maior atividade mitocondrial, mas sem diferença na produção de EROS em relação a oócitos de vacas com baixa CFA, o que sugere alta atividade de enzimas antioxidantes nas vacas com alta CFA. No entanto, a atividade dessas enzimas não foi avaliada. A hipótese deste trabalho é que oócitos provenientes de vacas com alta CFA são de melhor qualidade do que oócitos de vacas com baixa CFA, o que pode estar relacionado à maior atividade de enzimas antioxidantes, menor acúmulo de EROS e menor taxa de apoptose. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade dos oócitos obtidos de vacas mestiças com alta e baixa CFA, com ênfase na maturação nuclear, integridade do DNA e avaliar o *status* antioxidante do oócito e do fluido folicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia reprodutiva que promove ganho genético e aumenta a produção de animais em um curto período de tempo, beneficiando a comercialização de carne e leite, tanto para o mercado interno quanto para exportação. Desenvolvida na década de 1980, com o nascimento do primeiro bezerro em 1989 (Moore; Thatcher, 2006), a PIVE vem evoluindo constantemente, superando desafios e aumentando sua eficiência. No Brasil, durante a década de 1990, a técnica era utilizada exclusivamente para fins de pesquisa, sem impacto comercial relevante (Viana *et al.*, 2012). Inicialmente, os complexos *cumulus-oócito* (COCs) eram obtidos de ovários provenientes de abatedouros, o que limitava os programas de melhoramento genético e transferência de embriões (Crowe; Lonergan; Butler, 2021). A introdução da OPU transvaginal revolucionou a técnica, permitindo a coleta de oócitos de doadoras geneticamente superiores e, conseqüentemente, aumentando significativamente a eficiência do processo (Pieterse *et al.*, 1988).

A PIVE consiste em uma técnica de reprodução assistida realizada em laboratório, que envolve a coleta dos COCs, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos até o estágio de blastocisto, seguido da criopreservação ou transferência dos embriões (TE, Lonergan; Fair, 2016). Todos os procedimentos da PIVE devem ser realizados com extremo cuidado, a fim de evitar a contaminação do material. Ademais, o cultivo ocorre em estufa com temperatura de 38,5 °C, atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade controlada, sendo essencial que o equipamento mantenha essas condições constantes durante todo o processo (Rosa *et al.*, 2021).

Apesar de apresentar custos elevados, a PIVE viabiliza a utilização de sêmen de maior valor comercial, como o sêmen sexado (Pontes *et al.*, 2010), e facilita o manejo de sincronização tanto das doadoras para OPU quanto das receptoras (Crowe; Lonergan; Butler, 2021). Em propriedades onde há produção de um número elevado de embriões, os custos podem ser inferiores aos apresentados pela TE convencional (Viana *et al.*, 2012). Embora haja diferenças na qualidade dos embriões produzidos *in vivo* (Hansen,

2020), a PIVE tem apresentado avanços significativos, com maiores taxas de blastocistos e de prenhez, redução nas perdas gestacionais e melhorias nos meios de cultura e nas técnicas de criopreservação (Demetrio *et al.*, 2020).

A América do Norte é pioneira na produção mundial de embriões *in vivo* (Souza *et al.*, 2019). No entanto, no Brasil, o gado Nelore, responsável por aproximadamente 80% do rebanho bovino (Silva-Santos *et al.*, 2014b), e raças sintéticas como a Brahman (Crowe; Lonergan; Butler, 2021) têm impulsionado o avanço da PIVE. Isso se deve à maior contagem de folículos antrais (CFA) da subespécie *Bos taurus indicus*, a qual favorece o uso da OPU e reduz a necessidade de protocolos de superovulação (Pontes *et al.*, 2010), colocando o país como líder mundial em PIVE (Souza *et al.*, 2019). Nesse contexto, há um interesse crescente na aplicação dessa tecnologia em animais zebuínos com aptidão leiteira, como o Gir, e em cruzamentos como Gir x Holandês (Pontes *et al.*, 2010).

De acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), em 2022, foram produzidos globalmente 1.595.204 embriões *in vitro*, sendo que a América do Sul contribuiu com 300.191 embriões de vacas leiteiras e 378.710 de vacas de corte. Ainda segundo a IETS, vacas leiteiras produzem, em média, 15,5 COCs e 3,2 embriões viáveis por sessão de OPU. Dos COCs bovinos imaturos aspirados, aproximadamente 90% são maturados e progridem da prófase I para a metáfase II. Destes, 80% são fertilizados, e, dos fertilizados, de 30% a 40% alcançam o estágio de blastocisto. Cerca de 50% dos embriões transferidos sobrevivem até a confirmação da prenhez. Dessa forma, a qualidade dos COCs recuperados é um fator-chave para o sucesso do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Lonergan; Fair, 2016; Crowe; Lonergan; Butler, 2021).

Além disso, fatores relacionados à doadora, como população folicular, idade, *status* reprodutivo e metabólico, bem como fatores ambientais, como o estresse térmico, podem impactar a eficiência da PIVE. Esses fatores interferem no padrão de crescimento folicular, na secreção hormonal e na viabilidade dos oócitos, refletindo nas taxas de clivagem, formação de blastocistos e concepção (Baruselli *et al.*, 2019).

2.2. CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

As fêmeas bovinas nascem com uma reserva ovariana de folículos pré-definida, formada durante o desenvolvimento fetal a partir das células germinativas primordiais, que se proliferam por divisões mitóticas até atingirem sua produção máxima entre os dias 91 e 110 da gestação. Já os ovários são detectáveis a partir de 30 dias (Mossa; Evans, 2023). As células germinativas migram para os ovários e são envolvidas por células somáticas pré-granulosas, originando os oócitos e formando folículos primordiais, os quais entram em prófase da meiose por volta dos 75–80 dias. O desenvolvimento em folículos primários com células da granulosa cúbicas ocorre entre os dias 74 e 140 da gestação (Mossa; Evans, 2023).

Como não há evidências de neo-oogênese na vida adulta (Felici, 2010), a formação da reserva ovariana na fase fetal é crítica. Fatores maternos como nutrição e estresse térmico, impactam diretamente a fertilidade das filhas (Mossa; Evans, 2023). Mossa et al. (2013), alimentando novilhas de corte com dietas de 1,2 ou 0,6 de sua necessidade de manutenção a partir de 11 dias antes da inseminação artificial (IA) até 110 dias de gestação, demonstraram que a restrição alimentar reduz os níveis do hormônio antimülleriano (AMH) e a CFA na prole. De forma semelhante, filhas de vacas leiteiras sob estresse térmico apresentaram menores AMH e CFA (Succu et al., 2020).

Ao atingir a puberdade, as fêmeas passam a ovular um oócito fértil a cada ciclo estral, que dura em média 21 dias. O desenvolvimento folicular ocorre em duas ou três ondas (Gregory et al., 2009), iniciadas pelo aumento de FSH induzido pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O FSH ativa a enzima aromatase nas células da granulosa, promovendo a produção de estradiol, inibina e a proliferação celular (Ginther et al., 1996). Em seguida, o declínio do FSH leva à atresia dos folículos subordinados e permite que apenas o folículo dominante continue a crescer. O folículo dominante, dependente de LH, induz o pico de LH por meio da produção de estradiol, que culmina na ovulação e formação do corpo lúteo (CL), que secreta progesterona (Oliveira; Oliveira; Meira, 2010).

A CFA indica o número total de folículos antrais presentes nos ovários, sendo relativamente constante e pode ser estimada por ultrassonografia. Fêmeas da subespécie

Bos taurus taurus geralmente têm de duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo (Sartori *et al.*, 2016) e possuem cerca de 18 a 24 pequenos folículos antrais no início da onda folicular (Ireland *et al.*, 2007). Enquanto *Bos taurus indicus* apresentam, predominantemente, três ondas (Sartori *et al.*, 2016), com contagens de 40 a 50 folículos (Buratini *et al.*, 2000; Sartori; Bastos; Wiltbank, 2010). Tais diferenças podem estar relacionadas às concentrações de IGF-1 e insulina (Sartori; Bastos; Wiltbank, 2010; Sartori; Barros, 2011).

2.2.1. CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E FERTILIDADE

A CFA tem sido associada a parâmetros indicativos de fertilidade em alguns estudos. Ireland *et al.* (2008) sugeriram em seu estudo que a CFA pode ser utilizada como um preditor da longevidade das fêmeas no rebanho, visto que novilhas de corte mestiças (Hereford × Angus × Charolês) com alta CFA apresentaram aproximadamente cinco vezes mais oócitos saudáveis do que aquelas com baixa CFA. Neste estudo, a fêmea com maior média de CFA, de 49 folículos por onda, apresentou um total estimado de 40.960 oócitos saudáveis, enquanto aquela com a menor média, de 7 folículos por onda, apresentou apenas 1.920 oócitos saudáveis. Ainda segundo os autores, as fêmeas de alta CFA apresentaram maiores taxas de crescimento e atresia de folículos antrais. No entanto, essas fêmeas possuíam um pico de CFA 3,3 vezes maior durante as ondas foliculares em comparação às de baixa CFA, o que pode estar relacionado a um aumento na atresia. Mesmo perdendo um número de folículos sete vezes maior por onda, esses animais apresentaram um número 21 vezes maior de oócitos saudáveis. Segundo os autores, isso indica que essas fêmeas provavelmente possuem um número suficiente de oócitos viáveis para sustentar uma maior longevidade reprodutiva no rebanho, em comparação com aquelas de baixa CFA. Os autores relataram ainda que animais com baixa CFA apresentaram ovários 60% menores e menores concentrações circulantes de AMH.

Alguns autores observaram que a alta CFA tem sido associada à melhor fertilidade e maior taxa de concepção, bem como a uma maior taxa de prenhez (Mossa *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2016; Grala *et al.*, 2021). Mossa *et al.* (2012) observaram que vacas taurinas com alta CFA tiveram 3,3 vezes mais chance de prenhez ao final da estação reprodutiva e menor intervalo parto-concepção. Animais com CFA intermediária tiveram

1,7 vezes mais chance de concepção na 1ª IA comparados a vacas de baixa CFA. Da mesma forma, Garcia et al. (2020b), com vacas Girolando (*Bos taurus* × *Bos indicus*), também verificaram que a alta CFA se correlacionou positivamente com maior taxa de prenhez.

A progesterona é um importante hormônio sinalizador da função ovariana e do desenvolvimento embrionário. Jimenez-Krassel *et al.* (2009) realizaram um estudo com vacas de corte e Holandesas, no qual os animais com alta CFA apresentaram concentrações de progesterona de 30% a 50% superiores às dos animais com baixa CFA. Além disso, os animais com baixa CFA também apresentaram menores concentrações circulantes de progesterona durante a fase lútea e menor desenvolvimento endometrial. Baixas concentrações de progesterona estão diretamente ligadas à mortalidade embrionária. Segundo Diskin e Morris (2008), seus efeitos podem se iniciar no ciclo anterior ao estro, desencadeando a maturação prematura do oócito e comprometendo seu desenvolvimento futuro em embrião após a fertilização.

McNeel *et al.* (2017) também relataram menores concentrações de proteínas luminais em lavados uterinos, bem como menores medidas ultrassonográficas e físicas deste órgão, em novilhas Angus com baixa CFA em comparação com aquelas com alta CFA, especialmente em relação a proteínas detectadas por densitometria. Dessa forma, os autores sugerem uma possível diferença na função e no número de glândulas endometriais nesses animais em comparação com os de alta CFA.

Em contrapartida, Jimenez-Krassel *et al.* (2017) estudaram novilhas Holandesas de alta CFA, as quais apresentaram menor fertilidade, vida reprodutiva mais curta, redução média de 180 dias na vida produtiva, maiores chances de descarte após o nascimento do primeiro bezerro e, conseqüentemente, menor número de lactações em comparação com as de baixa CFA. Os animais de alta CFA, no presente estudo, também apresentaram período de espera voluntária maior e menor taxa de prenhez durante a primeira lactação. Entretanto, os autores ressaltaram que as razões pelas quais obtiveram esses resultados não puderam ser bem elucidadas, provavelmente pelo baixo número de animais utilizados. Outro achado foi observado em vacas Holandesas com baixa CFA,

que apresentaram maior fluxo sanguíneo para o folículo pré-ovulatório, maior área do CL e maior concentração de progesterona (Bonato *et al.*, 2022).

Em vacas Nelore, Seneda *et al.* (2016) realizaram quatro estudos com o intuito de avaliar a influência da CFA sobre a taxa de concepção após a IATF. No primeiro estudo, foram avaliadas novilhas cíclicas de 24 meses; nos demais, vacas multíparas no pós-parto. Nenhuma influência da CFA sobre a concepção foi observada nos três primeiros estudos. No entanto, no quarto estudo, a concepção foi superior no grupo de vacas com baixa CFA. Posteriormente, Morotti *et al.* (2018) observaram que vacas Nelore com baixa CFA tiveram melhor taxa de prenhez por IA em comparação àquelas com CFA intermediária e alta. Em seguida, Morotti *et al.* (2022) confirmaram que vacas Nelore com baixa CFA apresentaram maior taxa de concepção em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e maior diâmetro do folículo dominante. Oliveira Júnior *et al.* (2022) encontraram resultados semelhantes em novilhas Nelore pré-púberes. Machado *et al.* (2017) identificaram maior presença da proteína PCNA, relacionada à replicação celular, em folículos de animais com CFA baixa e intermediária.

2.2.2 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS, QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Devido à sua relativa constância e à associação com o número de folículos que se desenvolvem em cada onda, a CFA tem sido utilizada como ferramenta para seleção de doadoras para emprego de biotecnologias como OPU e PIVE. A recuperação de COCs e a eficiência na PIVE são influenciadas diretamente por essa variável. Burns *et al.* (2005) demonstraram que vacas holandesas de alta CFA apresentaram maior número de oócitos viáveis e maior taxa de blastocistos. E, em vacas Girolando, Garcia *et al.* (2020b) verificaram que a alta CFA se correlacionou positivamente com o número de COCs aspirados, cultivados e embriões viáveis.

Resultados semelhantes foram observados na PIVE a partir de COCs obtidos de vacas da raça Braford, em que vacas com alta CFA apresentaram maior produção de embriões em comparação às de baixa CFA (Silva-Santos *et al.*, 2014a). Em um estudo

com a raça Nelore, Santos et al. (2016) observaram que vacas com alta CFA produziram de 2,5 a 10 vezes mais COCs e até 30 vezes mais embriões viáveis do que vacas de CFA intermediária ou baixa. Garcia et al. (2020a) confirmaram esse resultado em uma sequência de dois experimentos, um com vacas sincronizadas previamente e outro em que os animais foram primeiramente aspirados sem sincronização, mas posteriormente sincronizadas e aspirados. Nos dois experimentos, vacas com alta CFA apresentaram maior número de COCs viáveis por OPU, produziram mais embriões em estágio de blastocisto e tiveram maior taxa de prenhez.

Os mecanismos relacionados à maior viabilidade oocitária e embrionária de vacas de alta CFA têm sido estudados. Burn et al. (2005) observaram que oócitos provenientes de ovários de vacas leiteiras com alta CFA apresentaram menor apoptose, maior fluxo sanguíneo nos folículos e maior produção da enzima óxido nítrico sintase endotelial em comparação com os de vacas com baixa CFA. Segundo Ireland et. (2009), novilhas de corte mestiças (Hereford × Angus × Charolês) de baixa CFA apresentaram maiores concentrações de FSH, o que aumentou a produção de estradiol nas células da granulosa. Esses animais também apresentaram maior expressão de genes para aromatase (CYP19A1) nas células da granulosa e níveis elevados de receptores de estrogênio (ESR1 e ESR2) nas células do cumulus, o que pode comprometer a maturação e causar distúrbios cromossômicos em oócitos bovinos. Utilizando ovários de vacas holandesas, Nagai *et al.* (2016) observaram maior taxa de maturação, maior proliferação das células da granulosa durante o cultivo e maior atividade mitocondrial no citoplasma antes da maturação em COCs provenientes de folículos de ovários com alta CFA. Essas características são importantes para a maturação nuclear e citoplasmática, indicando que esses COCs podem apresentar uma maior taxa de fertilização quando comparados aos provenientes de ovários com baixa CFA.

Entretanto, foi observada maior expressão de mRNA de genes que interferem na maturação oocitária e na expansão de células do cumulus em vacas de baixa CFA (Rosa *et al.*, 2018). Em um estudo de Lima *et al.* (2020), os autores constataram uma maior concentração de progesterona e maior diâmetro do folículo dominante na IATF em vacas Nelore de baixa CFA. Além disso, esses animais apresentaram regulação positiva de genes associados a diversos processos celulares. No oócito, observou-se a expressão

aumentada de BMP15, HAS2 e EGFR, relacionados à comunicação intercelular; NPR2 e NPR3, envolvidos no controle do desenvolvimento meiótico; H1FOO, associado à manutenção da identidade celular; IGFBP2, ligado ao crescimento folicular; GAPDH e NFkB2, que desempenham papéis na regulação metabólica e sinalização celular; além de HSF1, envolvido na resposta ao estresse celular. Nas células do *cumulus*, foram identificados níveis elevados de EGFR, relacionado à comunicação intercelular; NPR2 e NPR3, que regulam o desenvolvimento meiótico; RGS2, DNMT3A, IIDAC2 e PAF1, moduladores epigenéticos e do controle meiótico; GSK3A, IGF1R e IGFBP2, envolvidos no crescimento folicular; ATP5L, TFAM e PFKP, associados à manutenção celular; além de HSP90AA1, HSPA5, HSPD1, SOD1 e PRDX3, que atuam na resposta ao estresse celular.

2.2.3 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E RESPOSTA À SUPEROVULAÇÃO

A associação entre CFA e resposta à superovulação é amplamente relatada. No entanto, a variabilidade na resposta aos protocolos hormonais depende de características específicas das doadoras, especialmente os ovários (Zangirolamo et al., 2018; Ireland et al., 2007). Animais de baixa CFA podem apresentar redução na resposta a protocolos de superovulação, menor presença de CL, menor número de embriões recuperados no D7 e menor número de embriões transferíveis de alta qualidade (Ireland et al., 2007). Da mesma forma, doadoras Braford com alta CFA responderam melhor à OPU/PIVE seguida de superovulação, em comparação com vacas de baixa CFA (Silva-Santos et al., 2014a).

Ademais, há evidências de que vacas com baixa CFA podem apresentar limitações fisiológicas. Singh et al. (2004) e Morotti et al. (2015; 2021) associaram a baixa CFA à menor resposta superovulatória e Tessaro et al. (2011) à menor vascularização folicular e menor expressão da proteína eNOS óxido nítrico sintase endotelial, que atua no processo de vascularização folicular. Ireland et al. (2009) relataram maior expressão de catepsina em células do cumulus de vacas com baixa CFA e Scheetz et al. (2010) observaram menor produção de estradiol e AMH nas células da granulosa, mesmo com alta expressão de mRNA de aromatase, o que sugere menor ação do FSH. Contudo, Lollato et al. (2022) mostraram que vacas tratadas com dose alta de FSH (300 UI)

apresentaram maior número de CL, estruturas totais, embriões viáveis e congelados, independentemente da CFA, sugerindo que o protocolo hormonal pode mitigar diferenças entre categorias. Sendo assim, ainda existem desafios quanto à compreensão plena da influência da CFA sobre a eficiência da PIVE (Zangirolamo et al., 2018).

2.3. VARIABILIDADE E REPETIBILIDADE DA CFA

Os mamíferos já nascem com uma reserva ovariana formada por folículos primordiais, variando de aproximadamente 14.000 a 250.000 em bovinos. Essa reserva sinaliza a quantidade de oócitos disponíveis para crescimento nas ondas foliculares do ciclo estral. Contudo, pouco se conhecia sobre a variabilidade do número de oócitos não ovulatórios que cresciam durante as ondas foliculares de um mesmo ciclo estral, ou seja, se em vacas com alta CFA haveria crescimento simultâneo de um maior número de folículos, enquanto em vacas com baixa CFA haveria crescimento de um menor número de folículos em cada onda do ciclo (Burns *et al.*, 2005).

Com o passar dos anos, diversos autores observaram uma alta repetibilidade da CFA em uma mesma vaca (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2012). Em vacas da raça Braford, observou-se uma variação da repetibilidade de 0,90 a 0,92 (Silva-Santos *et al.*, 2014a), e em vacas oriundas de cruzamentos entre taurinos e zebuínos (Angus × Nelore), essa repetibilidade variou de 0,77 a 0,96 (Silva-Santos *et al.*, 2014b). Apesar de Burns *et al.* (2005) relatarem valores de CFA bastante variáveis entre vacas da raça Holandesa, podendo variar até sete vezes de um animal para outro, as mesmas apresentaram alta repetibilidade da CFA individual (0,95). De forma geral, vacas *B. indicus*, como as da raça Nelore, possuem mais folículos pequenos, com média de 18 a 25 COCs recuperados por sessão de OPU, enquanto em vacas *B. taurus* são recuperados de 4 a 14 COCs (Pontes *et al.*, 2011; Silva-Santos *et al.*, 2014a).

Inicialmente, os estudos sobre avaliação da população folicular tiveram como foco a fase de recrutamento. Eram conduzidos com a técnica de cauterização folicular, uma vez que o processo de desenvolvimento das ondas foliculares ocorre de forma contínua, impedindo o uso de imagens por laparoscopia, endoscopia ou ultrassonografia. Contudo, essa técnica é considerada invasiva e não pode ser repetida (Boni *et al.*, 1997). Matton *et al.* (1981) realizaram um estudo cauterizando os folículos maiores que 5 mm dos ovários

de novilhas da raça Holandesa, utilizando uma unidade eletrocirúrgica após laparotomia médio-ventral, e demonstraram que o dia do ciclo estral afeta o recrutamento dos folículos. Posteriormente, Adams, Matteri e Ginther (1992) cauterizaram o folículo dominante, o que acarretou o adiantamento do pico de FSH e da segunda onda folicular.

Pieterse *et al.* (1988) desenvolveram a técnica de OPU, que possibilitou a avaliação da população antral. Boni *et al.* (1997) observaram alta repetibilidade da CFA após várias aspirações consecutivas em vacas da raça Holandesa. Dessa forma, com o auxílio da ultrassonografia, essa técnica permite classificar os animais em baixa, intermediária ou alta CFA, de acordo com o número de folículos antrais ≥ 3 mm presentes nos dois ovários, sendo possível realizar essa estimativa com apenas um único exame, de forma confiável e independente de fatores fisiológicos, como idade e número de ondas foliculares, ou ambientais, como estação do ano (Morotti *et al.*, 2021).

A CFA também tem sido estudada por meio da dosagem de AMH, que é sintetizado pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais em desenvolvimento (Morotti *et al.*, 2021; Ireland *et al.*, 2008; 2011). Estudos indicam que essa associação é consistente em diversas espécies, incluindo camundongos e mulheres, refletindo a utilidade do AMH como biomarcador confiável da reserva ovariana e da população folicular (Ireland *et al.*, 2008; 2011).

Apesar da alta repetibilidade da CFA, o número de folículos diminui acentuadamente com o passar dos anos (Burns *et al.*, 2005). O declínio no número de folículos pode iniciar-se entre o quarto e o décimo ano de vida, chegando a valores muito baixos, próximos de zero, em animais com idade entre 15 e 20 anos (Erikson, 1966). Em contrapartida, em um estudo realizado por Burns *et al.* (2005), em novilhas e vacas holandesas lactantes e não lactantes, os animais apresentaram menor número de folículos por volta dos 2 anos de idade do que quando possuíam entre 10 e 12 meses.

No entanto, em um estudo realizado por Cummins *et al.* (2012), no qual foram avaliadas vacas da raça Holandesa com alto mérito genético para fertilidade, os autores não encontraram diferenças significativas no número de folículos entre os grupos, sugerindo que a CFA não deve ser utilizada como critério único para seleção, apesar dos estudos que demonstram melhores resultados reprodutivos em animais com alta CFA.

Outro fator apontado por Walsh *et al.* (2014) é que filhas de nulíparas apresentaram menor CFA em comparação com filhas de múltíparas lactantes, sugerindo que fatores metabólicos e hormonais relacionados à lactação podem interferir na foliculogênese fetal. No gado de corte, a herdabilidade foi estimada em $0,49 \pm 0,09$ por Oliveira Junior *et al.* (2017) e em $0,30 \pm 0,09$ por Grigoletto *et al.* (2020), ambos em vacas da raça Nelore.

Compreender a relação entre a CFA e a fertilidade muitas vezes pode ser difícil, pois existem muitos trabalhos norte-americanos, europeus e brasileiros, e a comparação entre eles pode causar disparidades devido às diferenças entre rebanhos, ambiente e sistemas de produção. Essa compreensão pode apresentar desafios até mesmo diante da diversidade de raças, aptidões e sistemas de produção dentro de um próprio país, como é o caso do Brasil, com as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* (Seneda *et al.*, 2016).

2.4. ATIVIDADE MITOCONDRIAL E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As mitocôndrias são organelas formadas por uma membrana dupla e são essenciais para algumas funções das células eucariontes, como produção de energia na forma de ATP (Roth, 2018). Nesse sentido, as mitocôndrias desempenham um papel importante na reprodução, como, por exemplo, no oócito imaturo e maduro, fornecendo ATP para a maturação citoplasmática e nuclear, colaborando com a fertilização até o desenvolvimento dos embriões (Moussa *et al.*, 2015). Níveis de ATP no citoplasma abaixo de 1,7 a 2 pM podem impedir a maturação oocitária (Yu *et al.*, 2010; Roth, 2018).

As mitocôndrias produzidas durante a oogênese até a fertilização serão responsáveis pela manutenção do conceito até o período de pré-implantação, quando novas mitocôndrias serão produzidas pelo embrião. Dessa forma, a quantidade de mitocôndrias presentes no oócito maduro determina a disponibilidade dos componentes da cadeia transportadora de elétrons necessários para a produção de ATP, influenciando seu desenvolvimento até a retomada da biogênese mitocondrial. Se houver pouco DNA mitocondrial (mtDNA), a capacidade de sintetizar esses componentes será limitada, reduzindo a eficiência da fosforilação oxidativa, e consequentemente, a disponibilidade energética (Roth, 2018). A má funcionalidade das mitocôndrias, bem como distúrbios em sua distribuição e a redução de seu número, pode acarretar falhas na maturação e

fertilização dos oócitos, além de problemas no desenvolvimento do embrião, levando à sua morte (Moussa *et al.*, 2015). As mitocôndrias encontram-se distribuídas por todo o citoplasma (Van Blerkom, 1990; Plante; King, 1994). Estudos realizados com camundongos mostraram que as mitocôndrias são transferidas, durante a quebra da vesícula germinativa e formação do fuso na metáfase I, para a região do núcleo (Van Blerkom; Runner, 1984; Calarco, 1995).

Nagai *et al.* (2006) utilizaram camundongos transgênicos para avaliar o desenvolvimento oocitário de acordo com a distribuição de mitocôndrias pelo citoplasma. Os oócitos com distribuição normal (perinuclear) obtiveram uma taxa de 82% de ativação e 46% de desenvolvimento para um embrião de oito células. Já os oócitos com distribuição aleatória e agrupamentos de mitocôndrias apresentaram taxa de ativação de 17% e seus embriões não clivaram. Da mesma forma, em um estudo com macacos *Rhesus*, foi demonstrada a presença de concentrações de mitocôndrias localizadas rente aos pronúcleos durante a fertilização (Squirrell *et al.*, citados por Bavister; Squirrell, 2000).

Os fatores que interferem na realocação das mitocôndrias pelo citoplasma, bem como sua importância, ainda são desconhecidos. Bavister e Squirrell (2000) sugeriram que esse tipo de organização pode estar relacionado ao grande tamanho do oócito, que impede a difusão eficiente de ATP, facilitando, assim, um suporte mais rápido e eficaz de energia e precursores de ácidos nucleicos ao núcleo, devido à replicação e transcrição do DNA. Os autores também sugeriram que as mitocôndrias necessitam de sinais provenientes do núcleo para sua maturação, o que justificaria sua aproximação do mesmo, a fim de facilitar essa sinalização, preparando-as para retomar suas funções no embrião. Por fim, outra possibilidade é que essas organelas protejam o núcleo contra as EROS, reduzindo as concentrações de oxigênio na região. No entanto, essa hipótese é de difícil comprovação e pode ser questionável, pois as próprias mitocôndrias são uma fonte potencial de EROS (Hockberger *et al.*, 1999).

A falha na pré-implantação de embriões também pode resultar da redução na produção de ATP pelas mitocôndrias, de defeitos pré-existent no mtDNA do oócito, do acúmulo de mutações no mtDNA relacionadas à idade, ou ainda de concentração elevada

de EROS, que afetam a biogênese mitocondrial (Nagai *et al.*, 2006). As mitocôndrias desempenham um papel crucial para a qualidade oocitária, contribuindo não apenas para a produção de energia, mas também para processos como a sinalização de cálcio, a regulação da apoptose celular e a geração de EROS, sendo essas organelas a principal fonte dessas moléculas nos oócitos, convertendo entre 0,2% e 2% do oxigênio absorvido em EROS (Moussa *et al.*, 2015; Malott *et al.*, 2022).

As EROS são moléculas derivadas de processos normais que ocorrem nas células, resultantes de desvios de elétrons ao longo da cadeia respiratória mitocondrial e de outros sistemas de transferência de elétrons. EROS podem ser moléculas de oxigênio ou nitrogênio com um ou mais elétrons desemparelhados. Já os radicais livres são moléculas ou átomos altamente reativos e instáveis que oxidam outras moléculas para tentar recuperar sua estabilidade. Por fim, dentro das espécies reativas, existe a categoria dos não radicais, que são moléculas menos reativas e desempenham papéis intermediários em reações de oxidação e redução, as quais geram ou inativam radicais livres (Keane; Ealy, 2024). Muitas moléculas podem interagir com os radicais livres; no entanto, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas são os mais suscetíveis à oxidação (Nandi *et al.*, 2019).

Exemplos de EROS incluem ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), radicais hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcoxila ($RO^{\bullet}$), conforme Morado et al. (2009). Entre os não radicais, destacam-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipobromoso ($HBrO$), ácido hipocloroso ($HClO$), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido peroxinitroso (HNO_3) e peróxidos orgânicos, que são moléculas derivadas do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nas quais um ou ambos os átomos de hidrogênio foram substituídos por radicais orgânicos (Keane; Ealy, 2024).

Algumas das principais fontes de EROS nos oócitos são a intensa atividade metabólica das células da granulosa e a presença de macrófagos e neutrófilos na parede dos folículos (Basini *et al.*, 2008). Por meio de processos enzimáticos e não enzimáticos, as EROS podem ser transformadas em outras espécies. O ânion superóxido é uma das EROS mais abundantes, caracterizando-se por sua elevada capacidade oxidativa. Essa molécula pode ser gerada pela redução de um único elétron do oxigênio molecular,

processo mediado por determinadas oxidoredutases presentes nas mitocôndrias (Zorov; Juhaszova; Sollott, 2014). O H_2O_2 , gerado pela dismutação espontânea ou catalisada pela SOD, pode extrair elétrons de macromoléculas celulares, acarretando danos à membrana (Zorov; Juhaszova; Sollott, 2014). Esse composto também pode servir como substrato para a geração de radicais hidroxila altamente reativos, os quais provocam fragmentação do DNA e ruptura da membrana plasmática, levando à morte celular (Keane; Ealy, 2024).

Por outro lado, as EROS são importantes, pois fazem parte de mecanismos fisiológicos, como a retomada da meiose, ativando o fator promotor da maturação, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a ruptura da parede do folículo (Barros *et al.*, 2019), além de participarem de vias de sinalização envolvidas na proteção celular (Mihalas *et al.*, 2017). O óxido nítrico é uma dessas moléculas que, além dessas funções, atua no desenvolvimento e na implantação embrionária. Doadores e inibidores de óxido nítrico podem interferir nesses processos, como o inibidor L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster), um inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase, o qual impede a formação do primeiro corpúsculo polar (Hattori; Tabata, 2006), assim como o doador nitroprussiato de sódio, que retarda a degradação da vesícula germinativa (Morado *et al.*, 2009).

Dessa forma, uma concentração equilibrada e moderada de EROS, regulada pelos mecanismos antioxidantes celulares, é essencial para o funcionamento adequado das células. No entanto, concentrações elevadas, que ultrapassam o limiar fisiológico, podem desencadear estresse oxidativo, causando danos celulares por meio de diversos mecanismos (Soto-Heras; Paramio, 2020).

2.5. ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio no metabolismo celular entre a produção e a eliminação das EROS, resultando no acúmulo dessas moléculas. O excesso de EROS ocasiona a oxidação de componentes celulares e causa danos significativos ao organismo animal, afetando inclusive a qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário (Keane; Ealy, 2024). Os principais mecanismos envolvidos incluem a oxidação de proteínas, a peroxidação de lipídios e a fragmentação do DNA (Yang *et al.*, 1998). Fatores ambientais e metabólicos, toxinas alimentares e

patógenos são exemplos de estressores que podem desencadear esse desequilíbrio (Roth, 2018).

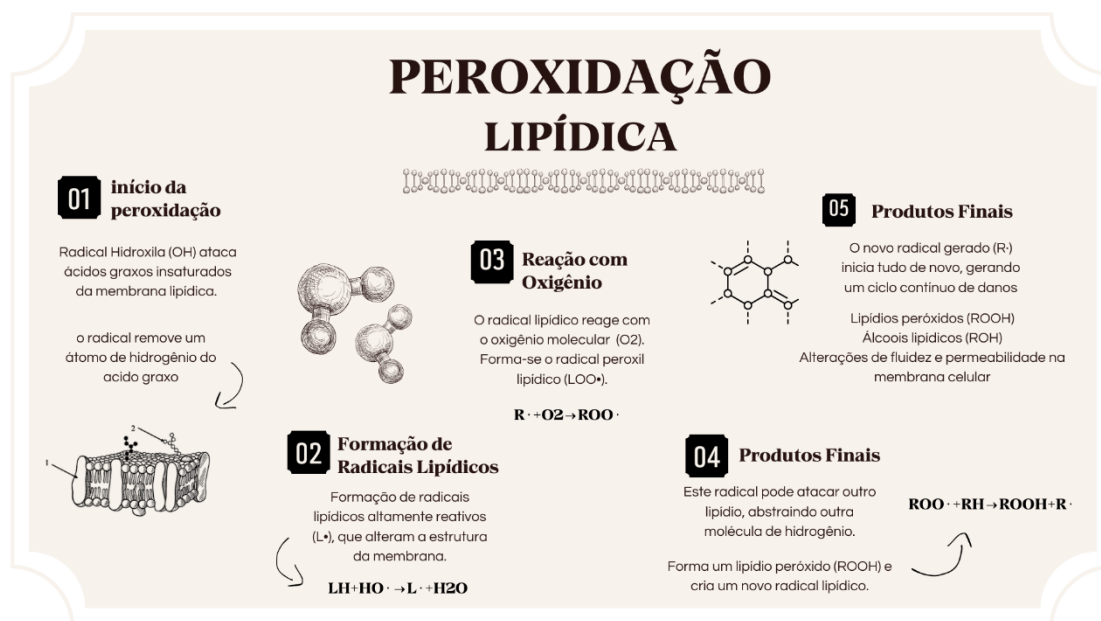
O mtDNA é particularmente vulnerável aos efeitos do estresse oxidativo devido à produção de EROS pelas mitocôndrias e à ausência de proteínas histonas, que desempenham um papel importante na proteção contra danos causados pelas EROS (Ames *et al.*, 1993). Dessa forma, os oócitos são células altamente suscetíveis aos efeitos das EROS, visto que possuem, em média, 260.000 mitocôndrias (Roth, 2018), enquanto outras células do corpo possuem entre 1.000 e 2.500 (Malott *et al.*, 2022; Keane; Ealy, 2024). A oxidação do DNA acarreta alterações em suas bases ou quebra da dupla hélice (Poetsch, 2020). Essas consequências são desencadeadas por mecanismos que envolvem reações de abstração e adição de radicais livres, com formação de radicais centrados em carbono, como, por exemplo, os danos causados pela oxidação de bases de pirimidina e purina pela radical hidroxila (Juan *et al.*, 2021).

Outra característica da oxidação do DNA é o menor potencial redox da guanina em comparação com outras bases (Aitken; Bromfield; Gibb, 2022). A oxidação da guanina ocorre pela reação das EROS com resíduos de guanosina do DNA. Ao ser oxidada, essa base recebe um átomo de oxigênio no carbono 8, formando a 8-hidroxi-guanina (8-oxoGua) e, posteriormente, o aduto de base oxidativa 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, ou 8OHdG (Ceylan *et al.*, 2017; Aitken; Bromfield; Gibb, 2022), resultando na fragmentação do DNA. Este processo causa ruptura de nucleossomos, acarretando problemas na compactação e no enrolamento do DNA dentro da cromatina (Juan *et al.*, 2021). Outra possível reação é a adição de radicais hidroxila também à posição C-8 na base guanina, resultando em um radical no nitrogênio da posição 7. Este, ao receber um elétron e um próton a partir de um intermediário instável, é reduzido, causando a fragmentação por abertura de anel (Juan *et al.*, 2021).

Na peroxidação lipídica não enzimática, as EROS oxidam uma cadeia lipídica insaturada na posição 2 dos glicerofosfolípidos da membrana celular, gerando um lipídio hidroperoxidado. Essa reação ocorre por meio da abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado, criando um radical lipídico centrado em carbono (L) que, ao se combinar com o oxigênio molecular, gera um radical peroxil instável (LOO). Por

fim, essa molécula retira um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado para se estabilizar, completando a reação. Já as formas enzimáticas podem ser desencadeadas por lipoxigenases, ciclooxygenases e citocromo P450 (Aitken; Bromfield; Gibb, 2022). Essas reações desestruturam a membrana, afetando sua fluidez e integridade.

Figura 1: Mecanismo da peroxidação lipídica em membranas celulares.



Legenda: Representação esquemática das etapas da peroxidação lipídica: inicia-se com o ataque do radical hidroxila (•OH) aos ácidos graxos insaturados da membrana, formando radicais lipídicos e produtos finais como peróxidos lipídicos (ROOH), que afetam a fluidez e a permeabilidade celular.

Fonte: Do autor (2025).

Já na oxidação de proteínas, ocorre dano à integridade dessas moléculas, perda da atividade catalítica de enzimas, paralisia na regulação das vias metabólicas, oxidação de resíduos de aminoácidos, agregação entre proteínas e clivagem de ligações peptídicas (Juan *et al.*, 2021). Alguns aldeídos, derivados da peroxidação lipídica, podem se ligar a proteínas, principalmente a resíduos de cisteína, lisina e histidina, interrompendo os mecanismos bioquímicos responsáveis pela manutenção da homeostase celular e pela conclusão da meiose (Aitken; Bromfield; Gibb, 2022). Para manter a homeostase metabólica e evitar interações com outras moléculas e proteínas, as proteínas oxidadas precisam ser hidrolisadas ou processadas pelo proteassoma (Juan *et al.*, 2021).

Durante a maturação oocitária, os oócitos requerem alta quantidade de energia para sustentar seus processos de transcrição, o que aumenta a produção de EROS pelas mitocôndrias (Chappel, 2013). Oócitos que se encontram em período de quiescência, ou seja, no estágio de prófase da primeira divisão meiótica, possuem apenas uma camada de células da granulosa. Durante esse período, também podem sofrer estresse oxidativo, reduzindo sua viabilidade e ocasionando perdas gestacionais (Tarin, 1996). Além disso, a exposição prolongada às EROS pode acelerar o envelhecimento oocitário. Esses oócitos apresentam maior incidência de deleções cromossômicas e mutações no mtDNA, o que compromete sua capacidade de fertilização (Mihalas *et al.*, 2017). No entanto, antioxidantes presentes no fluido folicular ajudam a controlar as EROS, prevenindo o envelhecimento e a atresia oocitária (Kala *et al.*, 2017).

O acúmulo de EROS no fluido folicular está diretamente relacionado ao estresse oxidativo nos oócitos e ao seu envelhecimento. Segundo Elizur *et al.* (2014), concentrações elevadas de H_2O_2 no fluido foliclar são uma das causas de envelhecimento do oócito e de embriões de má qualidade em mulheres. Os autores sugerem que, no processo de envelhecimento ovariano e consequente perda da qualidade oocitária, há aumento na produção de EROS ou diminuição da eficiência do sistema antioxidante. Ainda segundo os autores, com o envelhecimento e a atresia folicular, a concentração de EROS diminui, provavelmente devido à diminuição do metabolismo folicular.

O escore de condição corporal (ECC) também influencia o estresse oxidativo. Segundo Bernabucci *et al.* (2005), vacas leiteiras com ECC elevado ou que apresentaram perda de ECC mostraram mais metabólitos reativos de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma sanguíneo, além de concentrações reduzidas de grupos tiol, indicando maior sensibilidade ao estresse oxidativo. Khaled *et al.* (2020) demonstraram que tanto animais com baixo quanto com alto ECC apresentaram menor número de folículos. Além disso, fêmeas com ECC igual a 3 apresentaram maior atividade de catalase e melhor status antioxidante total nos ovários, útero, fluido folicular e fluido do oviduto. Bernal *et al.* (2010) relataram resultados semelhantes em ratos submetidos à restrição alimentar durante a gestação. Segundo os autores, esta condição pode desencadear aumento do estresse oxidativo, resultando em menor número de

folículos na prole e menor capacidade antioxidante dos mesmos. Já Anderson, Nisenblat e Norman (2010) observaram oócitos de má qualidade em mulheres obesas.

Apesar de a PIVE ser amplamente utilizada no melhoramento genético e reprodutivo, algumas etapas dessa técnica ainda enfrentam desafios relacionados ao estresse oxidativo. Um exemplo é a tensão de oxigênio durante os procedimentos, que gira em torno de 20%, enquanto nas tubas uterinas de mamíferos essa tensão varia entre 5% e 7%, ou seja, muito inferior à encontrada no ar atmosférico (Keane; Ealy, 2024). Outros fatores que contribuem para o aumento da produção de EROS incluem exposição à luz, variações de temperatura e de pH (Keane; Ealy, 2024). Além disso, a presença de metais como Fe^{2+} e Cu^{2+} nos meios de cultura aumenta a peroxidação lipídica, assim como a suplementação com soro, que contém aminas oxidases responsáveis pela geração de aldeídos citotóxicos como o H_2O_2 (Soto-Heras; Paramio, 2020).

O H_2O_2 prejudica a extrusão do corpúsculo polar e compromete a formação do fuso meiótico, devido à deficiência no fornecimento de ATP pelas mitocôndrias, levando a alterações morfológicas associadas à apoptose e à fragmentação do DNA (Chaube *et al.*, 2005; Soto-Heras; Paramio, 2020). Essa molécula também pode provocar peroxidação lipídica da membrana celular, afetando a fusão do espermatozoide com o oócito e prejudicando a fertilização (Tarín, 1996). Esse descompasso resulta em um desequilíbrio da homeostase oxidativa, comprometendo o desenvolvimento embrionário (Barros *et al.*, 2019). Para combater esses efeitos nocivos, o organismo dispõe de mecanismos antioxidantes capazes de eliminar o excesso de EROS e preservar o equilíbrio celular.

2.6. SISTEMA ANTIOXIDANTE

Um antioxidante é definido como qualquer substância molecular capaz de retardar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis, mesmo estando presente em concentrações relativamente baixas em comparação ao substrato. Em condições fisiológicas, os antioxidantes convertem as EROS em água, evitando, assim, a produção excessiva desses compostos (Andrade *et al.*, 2010).

Os sistemas antioxidantes existentes podem ser divididos em duas categorias: mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos, conhecidos como antioxidantes naturais, como a SOD, GPx e a catalase, atuam na prevenção de danos à estrutura celular (Andrade *et al.*, 2010). Já os sistemas não enzimáticos, como α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno e glutathiona, desempenham papel tanto na remoção de EROS quanto na reparação de lesões provocadas por essas moléculas (Morado *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2010). A vitamina E e o ubiquinol são exemplos de eliminadores de EROS lipofílicos, sendo a vitamina E amplamente reconhecida como o antioxidante lipofílico mais potente. Quando combinada à vitamina C, um antioxidante hidrofílico, potencial antioxidante da vitamina E pode ser ainda mais elevado (Aitken; Bromfield; Gibb, 2022).

Entre os mecanismos antioxidantes naturais, a SOD é responsável por reduzir o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), convertendo-o em O_2 e H_2O_2 . Em seguida, a catalase atua convertendo o H_2O_2 gerado pela SOD em H_2O e O_2 . Por fim, destaca-se o mecanismo enzimático que utiliza a glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo antioxidante tiol. Essa molécula, oxidada pela enzima GPx, remove o H_2O_2 e gera moléculas de água. O sistema da GSH é especialmente importante para a proteção do oócito e, posteriormente, do embrião (Keane; Ealy, 2024).

Figura 2: Ação das enzimas antioxidantes no controle do estresse oxidativo em bovinos.



Legenda: Ação das principais enzimas antioxidantes — superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase — atuando em cascata para neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROS), contribuindo para a proteção oocitária em vacas sob estresse oxidativo.

Fonte: Do Autor (2025)

A SOD possui três isoformas identificadas em mamíferos, com distinções quanto à estrutura, funções, local de atuação e produção. Essas isoformas são: Cu, Zn-SOD (SOD1), presente no citoplasma e no núcleo; Mn-SOD (SOD2), de atuação mitocondrial; e a SOD extracelular (SOD3), que atua em fluidos e espaços extracelulares (Nozik-Grayck *et al.*, 2005). Em um estudo conduzido por Combelles *et al.* (2010), foi relatada a presença das três isoformas no FF, sendo que a atividade de SOD foi maior em folículos menores, quando comparada à de folículos médios e grandes. Segundo Gupta *et al.* (2011), a atividade da catalase também foi maior no fluido de folículos menores obtidos de ovários de abatedouro. No entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar a atuação dessas enzimas no FF bovino.

O oócito é capaz de produzir GSH e aumenta seus estoques durante a ruptura da vesícula germinativa, atingindo seu pico máximo na metáfase II da maturação e na ovulação (cerca de 10 mM). Em seguida, os níveis de GSH diminuem durante a formação do zigoto, entre os estágios de 2 a 8 células (Malott *et al.*, 2022). A produção de GSH pelo oócito é essencial para a proteção do embrião até a quarta clivagem, quando então o próprio embrião passa a sintetizar GSH (Merton *et al.*, 2013). Outra função importante da GSH é a manutenção, formação e proteção do fuso meiótico contra a ação das EROS, além de atuar na redução das ligações dissulfeto do pronúcleo masculino após a fertilização (Keane; Ealy, 2024). Como embriões iniciais apresentam capacidade limitada de produzir GSH até seu desenvolvimento em blastocistos, moléculas como o β -mercaptoetanol e a cisteína são transferidas aos embriões por meio das junções comunicantes das células do cumulus, contribuindo para a síntese de GSH (García-Martínez *et al.*, 2020).

De acordo com Cetica *et al.* (2001), que relataram pela primeira vez a presença de um sistema antioxidante no oócito bovino, as atividades das enzimas SOD, catalase e GPx foram consideravelmente menores em oócitos desnudos em comparação aos COCs,

indicando a importância do controle da produção de EROS durante a maturação *in vitro*. Além disso, a SOD apresentou maior atividade em comparação com as demais enzimas, possivelmente devido à elevada produção de ânion superóxido, sendo necessária sua conversão em peróxido de hidrogênio. Assim, os mecanismos antioxidantes estão presentes tanto nos oócitos quanto nas células do cumulus, estendendo sua ação até o momento da fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial (Cetica *et al.*, 2001). Transcrições de Cu, Zn-SOD, GSH e catalase também foram encontradas em embriões bovinos, possivelmente de origem materna (Harvey *et al.*, 1995).

O FF é líquido que preenche a cavidade dos folículos e é de extrema importância para garantir a qualidade oocitária. Ele é proveniente do plasma sanguíneo e secreções das células da teca e da granulosa, sendo formado após o desenvolvimento do folículo secundário (Broi *et al.*, 2018). Ele contém nutrientes essenciais para o desenvolvimento oocitário, como proteínas, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, água, eletrólitos, exossomos (Rodrigues; Paula-Lopes, 2018). Alguns de seus componentes podem bloquear a maturação nuclear antes da ovulação (Gonçalves *et al.*, 2015). Dostál e Pavlok (1996) isolaram uma fração proteica do FF (peso molecular aproximado de 60 kDa) que inibiu a maturação. Já Yang, Kadam e Koide (1993) observaram a presença de uma proteína quinase solúvel no FF bovino com o mesmo efeito inibitório.

O FF também contém antioxidantes como GSH, cisteamina, taurina, vitaminas, melatonina e coenzima Q10. Estudos indicam que oócitos desenvolvidos em ambientes com maior atividade antioxidante podem apresentar maior fertilidade em comparação àqueles desenvolvidos em ambientes com baixos níveis antioxidantes (Khaled *et al.*, 2020). Além disso, a expressão de mRNA das enzimas antioxidantes produzidas pelo oócito varia de acordo com o tamanho do folículo e com o ambiente de maturação do oócito, seja *in vitro* ou *in vivo* (Gupta *et al.*, 2011). Lonergan *et al.* (2003) compararam a expressão de mRNA de enzimas antioxidantes em oócitos de abatedouro maturados *in vitro* com a de oócitos maturados *in vivo*, obtidos por meio de OPU 20 horas após o pico de LH. Oócitos maturados *in vitro* apresentaram maior expressão de Cu/ZnSOD, o que foi associado a uma maior necessidade de proteção contra o estresse oxidativo. O mRNA da MnSOD também apresentou maior expressão em oócitos derivados de pequenos folículos de ovários de abatedouro.

O estresse térmico é outro fator que pode aumentar a produção de EROS e desencadear um desequilíbrio no ambiente folicular, provocando alterações no sistema redox ao afetar a atividade de enzimas antioxidantes (Rodrigues; Paula-Lopes, 2018). Menores atividades de GPx foram observadas no FF de animais durante os meses mais quentes do ano, em comparação aos meses frios. Essa redução na atividade da enzima GPx pode resultar no acúmulo de H_2O_2 , o que é prejudicial ao oócito (Rodrigues; Paula-Lopes, 2018).

A idade materna também pode estar correlacionada com o potencial das defesas antioxidantes do FF. Com o avanço da idade, os mamíferos tendem a apresentar redução potencial antioxidante, o que compromete a neutralização das EROS e, conseqüentemente, a viabilidade oocitária (Mihalas *et al.*, 2017). Uma maior atividade de SOD foi observada no FF de mulheres entre 39 e 45 anos, em comparação com mulheres entre 27 e 32 anos, em programas de FIV (Carbone *et al.*, 2003). De maneira semelhante, a expressão ovariana de GPx foi maior em camundongos idosos do que em jovens, o que os autores associaram ao aumento da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Lim; Luderer, 2011).

2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reprodução é um fator de grande impacto mundial em fazendas leiteiras. Melhorar sua eficiência, bem como das biotecnologias, tem sido o foco de muitas pesquisas nesta área, visando o bem-estar dos animais, maior lucratividade e diminuição dos prejuízos causados por falhas reprodutivas. A relação entre CFA, índices reprodutivos e a eficiência da PIVE precisa ser melhor compreendida, levando em consideração a especificidade de grupos raciais e as condições experimentais. Apesar dos avanços na área, trabalhos futuros deveriam explorar de forma mais aprofundada a relação entre a CFA e o metabolismo oxidativo, incluindo a análise de marcadores moleculares adicionais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Reproduction**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 627-640, 1 nov. 1992. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0960627>.
- AITKEN, R. J.; BROMFIELD, E. G.; GIBB, Z. OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: the impact of oxidative stress on reproduction. **Reproduction**, [S.L.], v. 164, n. 6, p. 79-94, 1 dez. 2022. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-22-0126>.
- ALWARD, K.J.; COCKRUM, R.R.; EALY, A.D. Associations of antral follicle count with fertility in cattle: a review. **Jds Communications**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 132-137, mar. 2023. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jdsc.2022-0283>.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 90, n. 17, p. 7915-7922, set. 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>.
- ANDERSON, K.; NISENBLAT, V.; NORMAN, R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment – A review. **Australian And New Zealand Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 8-20, fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1479-828x.2009.01119.x>.
- ANDRADE, E.R. *et al.* Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79-85, jun. 2010.
- BARROS, F.D.A. *et al.* Oxidative homeostasis in oocyte competence for in vitro embryo development. **Animal Science Journal**, [S.L.], v. 90, n. 10, p. 1343-1349, 30 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.13256>.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. In: Congresso brasileiro de reprodução animal, 2, 2019, Gramado. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 2019. v. 43, p. 315-326.
- BASINI, G. *et al.* Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 269, 2008. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd07147>.
- BAVISTER, B. D.; SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. **Human Reproduction**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 189-198, 1 jul. 2000. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.189.

BERNABUCCI, U. *et al.* Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 88, n. 6, p. 2017-2026, jun. 2005. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72878-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72878-2).

BERNAL, A. B. *et al.* Maternal Undernutrition Significantly Impacts Ovarian Follicle Number and Increases Ovarian Oxidative Stress in Adult Rat Offspring. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 12, p. 15558, 13 dez. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015558>.

BONATO, D.V. *et al.* Follicular dynamics, luteal characteristics, and progesterone concentrations in synchronized lactating Holstein cows with high and low antral follicle counts. **Theriogenology**, [S.L.], v. 179, p. 223-229, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.006>.

BONI, R *et al.* Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 277-289, jul. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)84075-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(97)84075-7).

BROI, M. G. da. *et al.* Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. **Journal Of Assisted Reproduction And Genetics**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 735-751, 2 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>.

BURATINI, J. *et al.* Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 421-431, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00359-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00359-9)

BURNS, D. S. *et al.* 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**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 54-62, 1 jul. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>.

CALARCO, P. G. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. **Developmental Genetics**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 36-43, jan. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.1020160108>.

CARBONE, M.C. *et al.* Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. **Molecular Human Reproduction**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 639-643, 1 nov. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gag090>.

CETICA, P. D. *et al.* Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte in Vitro Maturation. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 57-64, Jan. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540119253>.

CEYLAN, D. *et al.* DNA redox modulations and global DNA methylation in bipolar disorder: effects of sex, smoking and illness state. **Psychiatry Research**, [S.L.], v. 261, p. 589-596, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2017.12.051>.

CHAPPEL, S. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. **Obstetrics and Gynecology International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-10, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/183024>.

CHAUBE, S. K. *et al.* Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. **Apoptosis**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 863-874, ago. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-005-0367-8>.

COMBELLES, C. M. H. *et al.* Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. **Reproduction**, [S.L.], v. 139, n. 5, p. 871-881, maio 2010. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-09-0390>.

CROWE, A. D.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Invited review: use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 104, n. 12, p. 12189-12206, dez. 2021. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2021-20281>.

CUMMINS, S.B. *et al.* Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: ii. ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 95, n. 7, p. 3698-3710, jul. 2012. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4976>.

CUSHMAN, R. A. *et al.* Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight^{1,2}. **Journal Of Animal Science**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 1971-1980, 1 jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1728>.

DEMETRIO, D. G. B. *et al.* How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1-13, 22 jul. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0053>.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 260-267, jul. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>.

DOSTÁL, J.; PAVLOK, A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. **Reprod Nutr Dev**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 681-690, 1996.

ELIZUR, S. E. *et al.* Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. **Gynecological Endocrinology**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 705-707, 11 jul. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/09513590.2014.924100>.

ERICKSON, B. H. *et al.* Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal Of Animal Science**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 800-805, 1 ago. 1966. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas1966.253800x>.

EVANS, A. C. O. *et al.* Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. **Reproduction in**

Domestic Animals, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 31-37, 25 Jul. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>.

FELICI, M. de. *et al.* Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. **Molecular Human Reproduction**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 632-636, 19 jan. 2010. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gaq006>.

GARCIA, S. M. *et al.* Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 221, p. 106601, out. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106601>. A.

GARCIA, S. M. *et al.* Effect of the antral follicle count of Bos taurus × Bos indicus dairy cows on in vitro embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], p. 2171-2178, 7 ago. 2020. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5supl1p2171>. B.

GARCÍA-MARTÍNEZ, T. *et al.* Glutathione Ethyl Ester Protects In Vitro-Maturing Bovine Oocytes against Oxidative Stress Induced by Subsequent Vitricification/Warming. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 20, p. 7547, 13 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21207547>.

GINTHER, O.J. *et al.* Selection of the Dominant Follicle in Cattle1. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1 dez. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1187>.

GONÇALVES, M. C. *et al.* Criotolerância de oócitos e embriões bovinos maturados com líquido follicular e/ou β-mercaptoetanol. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 205-216, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v16i227457>.

GRALA, T.M. *et al.* Investigating anogenital distance and antral follicle count as novel markers of fertility within a herd of cows with positive or negative genetic merit for fertility traits. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 104, n. 12, p. 12939-12952, dez. 2021. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-19948>.

GREGORY, R. M. *et al.* Follicular dynamics and hormone therapy in the regulation of estrous cycle in cows. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 148-152, dez. 2009.

GRIGOLETTO, L. *et al.* Genetic Parameters and Genome-Wide Association Studies for Anti-Müllerian Hormone Levels and Antral Follicle Populations Measured After Estrus Synchronization in Nellore Cattle. **Animals**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1185, 13 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani10071185>.

GUPTA, S. *et al.* Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 673, 2011. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd10270>.

HANSEN, P. J. Implications of Assisted Reproductive Technologies for Pregnancy Outcomes in Mammals. **Annual Review of Animal Biosciences**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 395-413, 15 fev. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-084010>.

HARVEY, M. B. *et al.* Expression of Genes Encoding Antioxidant Enzymes in Preimplantation Mouse and Cow Embryos and Primary Bovine Oviduct Cultures Employed for Embryo Coculture1. **Biology of Reproduction**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 532-540, 1 set. 1995. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod53.3.532>.

HATTORI, M.; TABATA, S. Nitric oxide and ovarian function. **Animal Science Journal**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 275-284, 26 maio 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00349.x>.

HOCKBERGER, P. E. *et al.* Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 96, n. 11, p. 6255-6260, 25 maio 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.11.6255>.

IETS. 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, [S.L.], v. 4, n. 41, p. 1-25, 2023.

IRELAND, J. J. *et al.* 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**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 1687-1695, 21 mar. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dem071>.

IRELAND, J.L.H. *et al.* Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle1. **Biology of Reproduction**, [S.L.], v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 1 dez. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>.

IRELAND, J.J. *et al.* Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle1. **Biology of Reproduction**, [S.L.], v. 80, n. 5, p. 954-964, 1 maio 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.073791>.

IRELAND, J. J. *et al.* Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1, 2011. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd10226>.

JIMENEZ-KRASSEL, F. *et al.* 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**, [S.L.], v. 80, n. 6, p.

1272-1281, 1 jun. 2009. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093>.

JIMENEZ-KRASSEL, F. *et al.* A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 100, n. 6, p. 5019-5027, jun. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12277>.

JUAN, C. A. *et al.* The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4642, 28 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094642>.

KALA, M. *et al.* Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. **Reproductive Medicine and Biology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 28-35, 26 dez. 2016. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12013>.

KEANE, J. A.; EALY, A. D. An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during In Vitro Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects. **Animals**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 330, 21 jan. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani14020330>.

KHALED, A. *et al.* Impact of Body Condition Score on Oxidative Stress Status in Cow's Reproductive Tract. **Macedonian Veterinary Review**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 93-101, 1 out. 2020. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/macvetrev-2020-0021>

LIM, J.; LUDERER, U. Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 775-782, 8 dez. 2010. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.088583>.

LIMA, M. A. *et al.* Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-13, 11 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>.

LOLLATO, J.P.M. *et al.* In vivo embryo production in bovine donors with low and high antral follicle counts superovulated with low and high FSH doses. **Livestock Science**, [S.L.], v. 262, p. 104985, ago. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104985>.

LONERGAN, P. *et al.* Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone

surge. **Molecular Reproduction And Development**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 297-305, 12 set. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10357>.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 255-268, 15 fev. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>.

MACHADO, F. Z. *et al.* Cell proliferation in ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females with different antral follicle count. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1307-1311, 12 nov. 2017.

MALOTT, K. F *et al.* Glutathione deficiency decreases lipid droplet stores and increases reactive oxygen species in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, [S.L.], v. 106, n. 6, p. 1218-1231, 3 mar. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioac032>.

MAREI, W. F.A. *et al.* Metabolic and antioxidant status during transition is associated with changes in the granulosa cell transcriptome in the preovulatory follicle in high-producing dairy cows at the time of breeding. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 105, n. 8, p. 6956-6972, ago. 2022. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2022-21928>.

MARTINEZ, M. F. *et al.* Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, [S.L.], v. 85, n. 3, p. 466-475, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.026>.

MATTON, P. *et al.* Growth and Replacement of the Bovine Ovarian Follicles during the Estrous Cycle1. **Journal Of Animal Science**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 813-820, 1 abr. 1981. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas1981.524813x>.

MCNEEL, A. K. *et al.* Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 179, p. 1-9, abr. 2017. Elsevier BV.

MERTON, J.s. *et al.* Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 365-371, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.025>.

MIHALAS, B. P. *et al.* Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, n. 1, p. 1-10, jan. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4015874>.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 100, n. 12, p. 10314-10331, dez. 2017. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13138>.

MOORE, K.; THATCHER, W. W. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 89, n. 4, p. 1254-1266, abr. 2006. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72194-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72194-4).

MORADO, S. A. *et al.* Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 608, 2009. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd08198>.

MOROTTI, F. *et al.* Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction**, N, v. 12, n. 3, p. 479-486, jul. 2015.

MOROTTI, F. *et al.* Ovarian follicular dynamics and conception rate in Bos indicus cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 188, p. 170-177, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001>.

MOROTTI, F. *et al.* Contagem de folículos antrais: relação com a eficiência das biotécnicas e fertilidade. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 202-209, 2021. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.026>.

MOROTTI, F. *et al.* Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the timed artificial insemination in cattle. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-12, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0121>.

MOSSA, F. *et al.* Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 95, n. 5, p. 2355-2361, maio 2012. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4325>.

MOSSA, F. *et al.* Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring1. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 1-9, 1 abr. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>.

MOSSA, F.; EVANS, A.C.O. Review: the ovarian follicular reserve implications for fertility in ruminants. **Animal**, [S.L.], v. 17, p. 100744, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.animal.2023.100744>.

MOUSSA, M. *et al.* Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 155, p. 11-27, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.011>.

NAGAI, S. *et al.* Correlation of Abnormal Mitochondrial Distribution in Mouse Oocytes with Reduced Developmental Competence. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 210, n. 2, p. 137-144, 2006. Tohoku University Medical Press. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.210.137>.

NAGAI, K. *et al.* The relationship between antral follicles count in a bovine ovary and develop mental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral follicles. **Biomedical Research**, Tokyo, v. 1, n. 37, p. 1-9, 19 dez. 2015.

NANDI, A. *et al.* Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2019, p. 1-19, 11 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/9613090>

NOZIK-GRAYCK, E. *et al.* Extracellular superoxide dismutase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 37, n. 12, p. 2466-2471, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.012>.

OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA FILHO, J. P. de.; MEIRA, C. de. Dinâmica folicular ovariana comparativa entre as espécies bovina e equina. **Pubvet**, Londrina, v. 8, n. 4, p. 1-13, fev. 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, G. A. *et al.* Genomic study and Medical Subject Headings enrichment analysis of early pregnancy rate and antral follicle numbers in Nelore heifers1,2. **Journal Of Animal Science**, [S.L.], v. 95, n. 11, p. 4796-4812, 1 nov. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas2017.1752>.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. S. de *et al.* Anticipation of estrus and ovulation in Nelore heifers with low antral follicle count. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1211628576, 18 abr. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28576>.

PIETERSE, M.C. *et al.* M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 751-762, out. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90310-x](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x).

PLANTE, L.; KING, W. A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in Vitro and in Vivo fertilization. **Journal Of Assisted Reproduction And Genetics**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 515-529, nov. 1994. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02216032>.

POETSCH, A. R. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 18, p. 207-219, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>.

PONTES, J.H.F. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed

sperm. **Theriogenology**, [S.L.], v. 74, n. 8, p. 1349-1355, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>

RODRIGUES, T. A.; PAULA-LOPES, F. F. de. Deleterious effects of elevated temperature on bovine oocyte function: the role of follicular fluid. In: **VI CONGRESO AUPA - ASOCIACIÓN URUGUAYA DE PRODUCCIÓN ANIMAL**, 5. 2018. p. 108-118.

ROSA, C. O. *et al.* 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**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 921-929, 16 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13189>.

ROSA, C.O. *et al.* Lipid profile of in vitro embryos produced from Bos indicus cows with low and high antral follicle counts. **Livestock Science**, [S.L.], v. 250, p. 104586, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104586>.

ROTH, Z. Symposium review: reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. **Journal of Dairy Science**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 3642-3654, abr. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13389>.

SANTOS, G.M.G. *et al.* 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**, [S.L.], v. 165, p. 17-21, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.024>.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 151, 2010. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd09221>.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 124, n. 3-4, p. 244-250, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006>.

SARTORI, R. *et al.* Metabolic and endocrine differences between Bos taurus and Bos indicus females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 32-40, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>.

SCHEETZ, D. M. *et al.* Evidence That Low Antral Follicle Count During Follicular Waves Negatively Impacts FSH-Induced Capacity of Bovine Granulosa Cells to Produce Estradiol and Anti-Müllerian Hormone (AMH). **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 629-629, 1 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/biolreprod/83.s1.629>.

ŞEN, U.; KURAN, M. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 827-834, 1 jun. 2018. Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.17.0569>.

SENEDA, M.M. *et al.* Diferenças entre bos indicus e bos taurus que podem impactar a eficiência das biotécnicas da reprodução. In: 7º Simpósio internacional de reprodução aplicada, 2016, Londrina. p. 34-53.

SILVA-SANTOS, K. C. *et al.* 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**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 228-232, 23 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12255>. A.

SILVA-SANTOS, K. C. *et al.* 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**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 48-51, 2 ago. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12222>. B.

SINGH, J. *et al.* A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, [S.L.], v. 62, n. 1-2, p. 227-243, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020>.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 132, p. 342-350, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>.

SOUZA, A. C. C. *et al.* Influence of the antral follicle count on bovine in vitro embryo production from Bos indicus and Bos taurus donors. **Rev Bras Reprod Anim**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 13-17, jan. 2019.

SUCCU, S. *et al.* Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 103, n. 12, p. 11957-11969, dez. 2020. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18678>.

TARIN, J. J. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. **Molecular Human Reproduction**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 717-724, 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/2.10.717>.

TESSARO, I. *et al.* The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries1. **Journal of Animal Science**, [S.L.], v. 89, n. 8, p. 2389-2396, 1 ago. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2010-3714>.

VAN BLERKOM, J.; RUNNER, M. N. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. **American Journal Of Anatomy**,

[S.L.], v. 171, n. 3, p. 335-355, nov. 1984. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001710309>.

VAN BLERKOM, J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. **Journal Of Electron Microscopy Technique**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 324-346, dez. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.1060160405>.

VASCONCELOS, G. L. de et al. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, in vitro embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 217, p. 106357, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106357>.

VIANA, J.H.M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim. Reprod**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 12-18, jan. 2012.

WALSH, S.W. *et al.* Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 97, n. 7, p. 4503-4511, jul. 2014. American Dairy Science Association.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7758>.

YANG, L. S.; KADAM, A. L.; KOIDE, S. S. Identification of a cAMP-dependent protein kinase in bovine and human follicular fluids. **Biochem Mol Biol Int**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 521-525, nov. 1993.

YANG, H. W. *et al.* Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 998-1002, 1 abr. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/13.4.998>.

ZANGIROLAMO, A.F. *et al.* Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 310-315, 2018. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-ar2018-0072>.

YU, Y.; *et al.* Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 224, n. 3, p. 672-680, 25 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22171>.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 909-950, jul. 2014. American Physiological Society.
<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

Segunda parte – Artigo

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Animal Production Science

28

29

30

31

32

33 **Qualidade e status antioxidante de oócitos recuperados de doadoras *Bos taurus* x**

34 ***Bos Indicus* com alta ou baixa contagem de folículos antrais**

35

36 **Quality and antioxidant status of oocytes retrieved from *Bos taurus* x *Bos Indicus***

37 **donors with high or low antral follicle counts**

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53 **Resumo**

54 **Contexto**

55 A contagem de folículos antrais (CFA) em vacas tem sido associada à fertilidade, mas
56 sua relação com aspectos fisiológicos, como o estado antioxidante dos oócitos, é pouco
57 compreendida.

58 **Objetivos**

59 Objetivou-se avaliar as taxas de maturação e de apoptose dos oócitos de vacas mestiças
60 com diferentes CFA e determinar o estado antioxidante dos oócitos.

61 **Métodos**

62 Foram utilizadas 26 vacas lactantes mestiças Holandês x Gir, divididas em dois grupos
63 genéticos (G1: 1/2 + 5/8 HG, n=9; G2: 3/4 + 7/8 HG, n=13) e classificadas como de baixa
64 (G1: n=6; G2: n=8) ou alta (G1: n=3; G2: n=5) CFA. Foram coletados COCs para
65 avaliação das taxas de maturação nuclear e apoptose, atividade mitocondrial e produção
66 de espécies reativas de oxigênio (EROS) e fluido folicular (FF) para mensuração da
67 atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase
68 (GPx).

69 **Principais resultados**

70 O número de COCs recuperados foi menor em vacas com baixa CFA em comparação às
71 de alta CFA (G1: $5,49 \pm 0,10$ vs. $10,43 \pm 2,59$ e G2: $2,65 \pm 0,48$ vs. $8,08 \pm 1,55$; $P < 0,05$).

72 A proporção de COCs degenerados foi maior no G2 do que no G1 ($24,69 \pm 3,50$ vs. $36,77$
73 $\pm 4,55\%$). Oócitos de vacas com baixa CFA do G1 apresentaram maior atividade
74 mitocondrial e produção de EROS em comparação aos de vacas de alta CFA ($19,56 \pm$
75 $6,17$ vs. $7,11 \pm 2,76$ e $38,98 \pm 10,59$ vs. $5,04 \pm 1,68$ unidades arbitrárias – UA,

respectivamente; $P < 0,05$). No G2, a produção de EROS foi maior em oócitos de vacas de baixa CFA ($26,52 \pm 8,19$ vs. $9,01 \pm 2,36$ UA, $P < 0,01$). A atividade relativa (U/mg proteína/mL) de GPx e SOD no FF do G1 foi menor do que no G2 (GPx: $0,0185 \pm 0,0016$ vs. $0,0258 \pm 0,0018$, $P < 0,05$; SOD: $0,2001 \pm 0,01598$ vs. $0,2427 \pm 0,01582$; $P < 0,07$).

Conclusões

A CFA não foi associada à qualidade morfológica dos oócitos. Entretanto, maior atividade mitocondrial e/ou EROS, sem diferença na atividade das enzimas antioxidantes, sugere condição de estresse oxidativo em oócitos de vacas com baixa CFA.

Implicações

Os resultados contribuem para a seleção de doadoras para a PIVE.

Palavras-chave: apoptose, atividade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, estado antioxidante, estresse oxidativo, fluido folicular, glutathione peroxidase.

100 **Introdução**

101 A contagem de folículos antrais (CFA) tem se consolidado como uma importante
102 ferramenta na avaliação do potencial reprodutivo de fêmeas bovinas. Essa característica,
103 mensurada por meio de exames ultrassonográficos, permite estimar a população de
104 folículos antrais presentes nos ovários, sendo considerada um indicador do número de
105 oócitos disponíveis para procedimentos de biotecnologias da reprodução, como a ovum
106 pick-up (OPU) e a produção in vitro de embriões (PIVE) (Ireland *et al.*, 2008; Seneda *et*
107 *al.*, 2016). A CFA apresenta ampla variação entre indivíduos, mas se mantém
108 relativamente constante para uma mesma fêmea ao longo de sua vida e de suas ondas
109 foliculares, o que possibilita sua utilização como parâmetro de seleção (Ireland *et al.*,
110 2008; Grala *et al.*, 2021).

111 O número de complexos *cumulus-oophorus* (COCs) recuperados por OPU está
112 diretamente relacionado à CFA, sendo que vacas *Bos taurus* (Nagai *et al.*, 2016) e *Bos*
113 *indicus* (Garcia *et al.*, 2020a) com maior número de folículos antrais produzem maior
114 número de oócitos viáveis e, conseqüentemente, apresentam melhor desempenho na
115 PIVE. Além disso, vacas com alta CFA geralmente exibem características associadas à
116 alta fertilidade, como maior concentração do hormônio anti-Mülleriano (AMH) e melhor
117 resposta aos protocolos de superovulação (Ireland *et al.*, 2011). Em contraste, novilhas
118 mestiças (Hereford x Angus x Charolês) com baixa CFA apresentaram ovários menores
119 (Ireland *et al.*, 2008), menor resposta à superestimulação ovariana (Ireland *et al.*, 2007) e
120 índices inferiores de recuperação oocitária (Ireland *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2012).

121 No entanto, a relação entre CFA e fertilidade ainda não é plenamente
122 compreendida. Alguns autores relataram que vacas Nelore com baixa CFA podem

apresentar boa taxa de concepção (Morotti. 2016) e maior expressão de genes ligados à maturação oocitária, sugerindo que a qualidade dos oócitos poderia, em alguns casos, compensar a menor quantidade disponível (Seneda *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2018). Essa divergência de resultados pode estar relacionada a diferenças fisiológicas entre as subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, que apresentam populações foliculares naturalmente distintas (Baruselli *et al.*, 2007; Seneda *et al.*, 2016).

Outro fator que pode influenciar o sucesso reprodutivo associado à CFA é o status oxidativo do ambiente folicular; contudo, até o momento, não há estudos que tenham avaliado essa relação. O equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROS) e antioxidantes endógenos é fundamental para a competência oocitária, influenciando diretamente processos como a maturação nuclear e a viabilidade embrionária (Gupta *et al.*, 2011; Broi *et al.*, 2018; Marei *et al.*, 2022). Situações de estresse oxidativo, decorrentes do excesso de EROS e da insuficiência dos sistemas antioxidantes, podem comprometer a integridade do DNA e a função mitocondrial dos oócitos (Roth, 2018), fatores críticos para o desenvolvimento embrionário.

Grande parte do conhecimento sobre a relação entre CFA e qualidade oocitária provém de estudos realizados com ovários de abatedouro ou com oócitos coletados de vacas em diferentes fases do ciclo estral, o que gera alta variabilidade nos resultados (Ireland *et al.*, 2008; Seneda *et al.*, 2016). Além disso, no caso de vacas Girolando (*Bos indicus* x *Bos Taurus*) a relação entre CFA e qualidade oocitária foi descrita em apenas um estudo, que aborda a produção de embriões (Garcia *et al.*, 2020b). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de mais estudos que possibilitem uma melhor compreensão da relação entre CFA e qualidade oocitária.

Com base nas informações disponíveis na literatura, nós hipotetizamos que vacas de alta CFA produzem oócitos de melhor qualidade e que apresentam melhor *status* antioxidante. Assim, este estudo teve como objetivos avaliar a qualidade, por meio das taxas de maturação nuclear e apoptose, de oócitos obtidos de vacas leiteiras mestiças com alta e baixa CFA e determinar o status antioxidante dos oócitos.

Material e métodos

O projeto foi desenvolvido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Gado de leite), em Coronel Pacheco, MG, Brasil. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da EMBRAPA Gado de Leite (protocolo nº 4228110324).

Animais e manejo

Foram utilizadas vinte e seis vacas mestiças Holandês-Gir (1/2 HG: n=3; 5/8 HG: n=6; 3/4 HG: n=11; 7/8 HG: n=2), primíparas (n=12) e multíparas ≥ 2 partos (n=14), com média de produção de leite de $17,66 \pm 8,04$ kg/d e 104 ± 36 dias em lactação. As vacas foram submetidas a manejo alimentar semi-intensivo, no qual foram mantidas em pasto de *Brachiaria decumbens* nos períodos entre as ordenhas e suplementadas com silagem de milho e concentrado uma vez ao dia após serem ordenhadas pela manhã. A mineralização foi *ad libitum* em cochos. A água foi disponibilizada *ad libitum* em bebedouros nas instalações. As ordenhas foram realizadas duas vezes ao dia, às 5h e às 13h. A produção de leite foi mensurada uma vez por mês. O ECC (1 a 5, extremamente magro a gordo; Wildman *et al.*, 1982) foi determinado por um único avaliador nos dias de realização das aspirações foliculares (*ovum pick-up* – OPU). Os dados para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) foram coletados no site do Instituto Nacional

de Meteorologia e foi considerada a média dos valores de ITU dos meses de agosto, setembro e outubro. No período de realização do estudo, o ITU foi de $72,90 \pm 0,86$.

Delineamento experimental

Os animais foram submetidos ao exame ultrassonográfico dos ovários para avaliação da CFA imediatamente antes de cada uma das cinco sessões de OPU. Considerando todas as avaliações de cada vaca, foram calculados os quartis separadamente para cada grupamento genético. Então, a CFA média de cada vaca foi calculada e com base neste valor as vacas foram classificadas em categorias de alta e baixa CFA. Os animais com valores de CFA no primeiro e segundo quartis foram classificados como de baixa CFA, enquanto aqueles no quarto quartil foram considerados de alta CFA. Uma vaca 1/2 HZ e três vacas 3/4 HZ apresentaram valores de CFA no terceiro quartil e seus dados foram desconsiderados nas análises.

Posteriormente, os animais foram agrupados considerando a proximidade dos graus de sangue: G1 (1/2 + 5/8 HZ: alta CFA n=3 e baixa CFA n=6) e G2 (3/4 + 7/8 HZ: alta CFA n=5 e baixa CFA n=8).

Sincronização da onda folicular

Antes de cada sessão de OPU a emergência da onda folicular foi sincronizada. As vacas receberam um implante de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Cravinhos, São Paulo), 2 mL de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino, Cravinhos, São Paulo) e 2 mL de análogo de prostaglandina cloprostenol sódico (Sincrocio, Ouro Fino, Cravinhos, São Paulo), por via intramuscular, no momento da inserção do implante (dia zero – D0). Nos protocolos para aspiração dos COCs, o implante foi removido no D5. Nos protocolos

para aspiração do fluido do folículo dominante, o implante foi removido no D9 (Figura 1). Ao todo, foram realizadas cinco aspirações para coleta de COCs e três para a coleta de fluido folicular.

Aspiração folicular

Inicialmente, dois grupos de vacas foram formados para a realização das sessões de OPU e ambos os grupos foram aspirados na mesma semana, em dias alternados. As fêmeas foram distribuídas de modo a garantir a presença de representantes de todos os cruzamentos em cada dia de aspiração. Foi realizada a contenção dos animais e a anestesia epidural com a aplicação de 4 mL de lidocaína 2%, sem vasoconstritor (Anestésico L, Pearson, São Paulo e Bloc, JA Saúde Animal, Patrocínio Paulista, São Paulo) no espaço entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea. Após a anestesia, foi realizado o esvaziamento da ampola retal e, em seguida, a higienização da vulva com álcool 70%.

Para o procedimento de OPU utilizou-se um equipamento de ultrassom veterinário, um transdutor microconvexo endovaginal de 7,5 MHz (Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China) acoplado a uma guia de aspiração folicular e uma bomba de sucção a vácuo (WTA®, Cravinhos, São Paulo). A bomba de vácuo foi ajustada a uma pressão de sucção negativa para um fluxo de 15-20 mL/minuto. Para a coleta dos COCs, a bomba de vácuo foi acoplada a um tubo tipo Falcon conectado a uma linha de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento, a qual foi acoplada a uma agulha descartável de 18 G, submetendo todo o sistema a uma pressão negativa.

Com o ovário posicionado à frente do transdutor, os folículos com 3 a 8 mm de diâmetro foram puncionados e seus conteúdos coletados em tubos tipo Falcon contendo

10 mL de meio Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline (DMPBS®, REPRODUX, Itapira, SP, Brasil), acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB, Sigma, St. Louis, EUA) e 125 UI de heparina sódica/mL (HEPAMAX-S®, Blau, Cotia, São Paulo) a 37 °C. O tubo contendo os COCs e o fluido folicular foi conduzido ao laboratório e filtrado em um mini filtro (WTA®, Cravinhos, São Paulo). O conteúdo retido na malha do filtro foi transferido para placas de cultivo celular de 100 x 20 mm contendo DMPBS para rastreamento, avaliação e seleção dos COCs sob estereomicroscópio.

A aspiração do fluido folicular foi realizada mediante a identificação do folículo dominante por ultrassonografia. A dimensão do folículo aspirado considerando os dois maiores diâmetros da cavidade antral foi $1,74 \pm 0,48 \times 1,35 \pm 0,28$ mm. Animais que não apresentaram folículo dominante no momento da sessão não foram submetidos à aspiração. O procedimento foi conduzido conforme descrito anteriormente, com a diferença de que o fluido aspirado foi direcionado para um microtubo de 1,5 mL posicionado dentro do tubo tipo Falcon. Após a coleta, os microtubos contendo o fluido folicular foram armazenados em caixas de isopor contendo gelo para transporte ao laboratório, onde foram centrifugados por 10 min a $2.000 \times g$, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos criogênicos de 2 mL e armazenado em nitrogênio líquido até serem transferidos para o Laboratório de Pesquisa Animal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram armazenados em ultra-freezer a -80 °C. Os procedimentos foram repetidos cinco vezes, com um intervalo médio de $13 \pm 1,73$ dias entre as coletas de COCs e três vezes, com um intervalo médio de $22 \pm 15,5$ dias as coletas de fluido folicular.

Classificação dos complexos *cumulus-oophorus*

Os COCs recuperados foram classificados de acordo com sua morfologia em grau I (células do cumulus compactas, com mais de três camadas e citoplasma oocitário homogêneo), grau II (células do cumulus compactas, com menos de três camadas e citoplasma oocitário homogêneo), grau III (células do cumulus presentes, mas expandidas, e citoplasma oocitário contraído, degenerado, fragmentado ou com vacúolos), desnudo (citoplasma com granulações homogêneas e ausência de células do cumulus) e degenerado (citoplasma oocitário com granulações e células do cumulus ausentes). Os COCs de graus I e II foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV).

Maturação *in vitro*

A MIV foi realizada em meio de maturação comercial (BOTUFIV® Oocyte IVM, Botupharma, Botucatu, São Paulo), acrescido de 10% de SFB. A maturação foi feita em microtubos de 1,2 mL contendo 300 µL de meio MIV, nos quais foram adicionados até 30 COCs, mantendo-se a proporção de 10 µL de meio para cada COC. O meio foi coberto com 250 µL de óleo mineral (BOTUFIV® Oil, Botupharma, Botucatu, São Paulo). Os microtubos foram armazenados *overnight* em estufa a 38,5 °C, a 5% de CO₂ para estabilização do meio MIV. Após a classificação, os COCs de cada vaca foram adicionados a um dos microtubos preparados no dia anterior, gaseificados com 5% CO₂ e armazenados a 38,5 °C em transportadora de oócitos, onde os primeiros ficaram cerca de 4 horas e os últimos cerca de 30 minutos, até serem transportados ao Laboratório de Reprodução Animal do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, EMBRAPA – Gado de Leite, onde foram maturados em estufa a 38,5 °C, a 5% de CO₂. O tempo total de MIV foi de 22 a 24 horas. Ao fim da MIV, os COCs foram

desnudados em solução de PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, Sigma, St. Louis, EUA) acrescida de 0,1% de hialuronidase (Sigma, St. Louis, EUA) por meio de pipetagens sucessivas. Depois, foram lavados três vezes em PBS contendo 0,1% de PVP (polivinilpirrolidona, Synth, Diadema, São Paulo) aquecido a 37 °C.

Os oócitos destinados às análises de maturação nuclear e fragmentação de DNA foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4% em PBS por uma hora, na geladeira. Em seguida, foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de PBS-PVP e armazenados a 4 °C em tubos tipo Eppendorf com 1.000 µL de PBS-PVP. Os oócitos destinados às análises de atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), foram submetidos a colorações específicas após o desnudamento, como descrito a seguir.

Fragmentação de DNA e maturação nuclear

Após a fixação, os oócitos foram processados para o ensaio de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), utilizado para identificar fragmentos de DNA característicos do processo de apoptose. Utilizou-se o kit comercial DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Os oócitos de cada vaca, coletados nas três primeiras sessões de OPU, foram agrupados para a análise e permeabilizados em solução de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, EUA) a 0,2% em solução salina fosfatada por 5 minutos e lavados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos.

Em seguida, foram incubados em tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeos e enzima recombinante terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) por 1 hora a 37 °C em atmosfera

umidificada. No controle negativo, os oócitos foram incubados sem a enzima rTdT. No controle positivo, foram incubados com tampão de equilíbrio, enzima DNase (para degradação do DNA nas células, mimetizando o processo de morte celular) e a enzima fluoresceína-12-dUTP. Após a incubação, os oócitos foram transferidos para lâminas e corados com Prolong Diamond 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, St. Louis, EUA), um corante de DNA, e observados em microscópio de epifluorescência no aumento de 40x (Evos 5000, Thermo Fischer, EUA).

No total, 117 oócitos foram avaliados nos testes de TUNEL e DAPI (G1: alta CFA = 20, baixa CFA = 39; G2: alta CFA = 40, baixa CFA = 18). Cada oócito foi observado em filtro azul de 460 nm, para quantificação dos oócitos em metáfase II (oócitos maturados), determinada pela presença do núcleo e corpúsculo polar corados com DAPI. Para avaliação de fragmentação de DNA, característica do processo de apoptose, utilizou-se um filtro verde de 520 nm.

Atividade mitocondrial e produção de EROS

Os oócitos maturados provenientes da quarta e quinta OPU foram incubados em gotas de 50 µL contendo 50 nM do MitoTrackerRed CMX-Ros (MitoTracker™ Red CMXRos, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e 10 µM de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich®) durante 30 minutos a 38,5 °C. Em seguida, os oócitos foram lavados cinco vezes em gotas de 50 µL de PBS contendo 0,1% de PVP, e as lâminas foram preparadas para leitura.

O MitoTrackerRed CMX-Ros é um corante vermelho fluorescente que mancha mitocôndrias em células vivas e seu acúmulo é dependente do potencial de membrana

(Chazotte, 2011). O DCFDA é permeável à membrana e se difunde facilmente nas células. Dentro da célula, os grupos acetato são hidrolisados por esterases intracelulares, formando o composto 2',7'-diclorofluoresceína (DCHF), impermeável à membrana celular. O DCHF, em presença de EROS, é rapidamente oxidado e transformado em diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescência verde quando excitado em 503 nm.

As emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio de epifluorescência. A intensidade da fluorescência foi quantificada utilizando o software ImageJ (versão 1.49, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), por meio da média da densidade de pixels nas regiões de interesse (ROI) delimitadas sobre cada oócito. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA), que representam a intensidade relativa da fluorescência emitida. Ao todo, 156 oócitos foram analisados (G1: Alta CFA = 41, Baixa CFA = 48; G2: Alta CFA = 48, Baixa CFA = 19).

Análise enzimática no fluido folicular

As enzimas glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase foram quantificadas no fluido folicular por ensaio colorimétrico enzimático. A atividade da catalase foi medida pela decomposição de peróxido de hidrogênio a 240 nm (Aebi, 1984). A atividade da superóxido dismutase foi quantificada com base na oxidação do pirogalol a 570 nm (Madesh e Balasubramanian, 1997). A atividade da glutathione peroxidase foi medida pela avaliação da taxa de oxidação do NADP na presença de peróxido de hidrogênio, glutathione reduzida e glutathione redutase a 240 nm (Gunzler *et al.*, 1984).

O método de Bradford (Bradford, 1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteína nas amostras e normalizar os resultados. As leituras foram

realizadas utilizando um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As atividades enzimáticas foram expressas em unidades por miligrama de proteína (U por mg de proteína) por mL de fluido folicular. Ao todo, 61 amostras foram analisadas (G1: Alta CFA = 8, Baixa CFA = 18; G2: Alta CFA = 14, Baixa CFA = 21).

Análise estatística

Nas análises estatísticas foram considerados modelos lineares mistos generalizados, definindo a distribuição e a função de ligação em função do tipo de variável resposta analisada. Essas análises foram realizadas utilizando o PROC GLIMMIX do software Statistical Analysis System (SAS, v. 9.4). As variáveis CFA e número de COCs recuperados foram analisadas considerando a distribuição de Poisson e função de ligação log. Na análise das variáveis porcentagem de COCs viáveis, porcentagem de COCs degenerados, porcentagem de oócitos maturados e porcentagem de oócitos TUNEL positivos foi considerada a distribuição binomial e função de ligação logit. A atividade mitocondrial, a produção de EROS e atividade das enzimas antioxidantes foram analisadas considerando a distribuição Gama e função de ligação log. O modelo incluiu os efeitos aleatórios de animal e da sessão de OPU dentro de grupo de aspiração ou a coleta (1 a 3) de fluido folicular, os efeitos fixos de grupo genético, CFA dentro de grupo genético e ordem de parto dentro da combinação grupo genético x CFA. Produção de leite, dias em lactação e ECC foram consideradas como covariáveis. A área delimitada para quantificação da intensidade de fluorescência de cada oócito foi também considerada como covariável nas análises de atividade mitocondrial e EROS. As médias ajustadas de mínimos quadrados foram comparadas e a diferença estatística foi estabelecida a $P < 0,05$, considerando o teste F. Valores de P entre 0,05 e 0,10 foram

considerados como tendência. Os resultados são apresentados como *least square means* $\pm$ *standard error*.

Resultados

O número de folículos antrais tendeu ($P < 0,08$) a ser maior em vacas do G1 do que em vacas do G2 e maior número de COCs foi recuperado de vacas do G1 em comparação com as do G2 ($7,56 \pm 1,20$ vs $4,63 \pm 0,63$; $P < 0,05$). Como apresentado na tabela 1, e em conformidade com a categorização em vacas de alta e baixa CFA, vacas de alta CFA tanto do G1 quanto do G2 apresentaram mais folículos antrais em comparação com as de baixa CFA do respectivo grupamento genético ($P < 0,0001$). Adicionalmente, maior número de COCs foi recuperado das vacas de alta CFA, tanto no G1 quanto no G2 ($P < 0,0001$).

O número de COCs viáveis foi maior em vacas do G1 em comparação ao G2 ($6,14 \pm 0,65$ vs $4,07 \pm 0,67$; $P < 0,05$). A porcentagem de COCs viáveis recuperados não diferiu entre vacas dos dois grupamentos genéticos (G1: $65,33 \pm 5,56\%$ vs G2: $69,63 \pm 7,27\%$; $P > 0,05$). No entanto, a porcentagem de COCs degenerados foi menor ($P < 0,05$) nas vacas do G1 ($24,70 \pm 3,50\%$) em comparação com as do G2 ($36,80 \pm 4,55\%$).

Como apresentado na tabela 1, o número de COCs viáveis foi maior em vacas de alta CFA do que em vacas de baixa CFA do G2 e não diferiu entre vacas de alta e baixa CFA do G1. No entanto, as porcentagens de COCs viáveis ($P > 0,05$) e de degenerados não diferiram ($P > 0,05$) entre vacas de alta e de baixa CFA do G1 e do G2.

A porcentagem de oócitos que apresentaram maturação nuclear não diferiu entre vacas dos grupos G1 e G2 ($51,84 \pm 6,98$ vs $52,51 \pm 0,71\%$; $P > 0,05$), assim como a porcentagem de oócitos apoptóticos também não diferiu entre os grupos genéticos (G1:

48,36 $\pm$ 10,26% vs G2: 1,76 $\pm$ 156,43%; $P > 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de maturação nuclear ($P > 0,05$) e de apoptose ($P > 0,05$) entre as categorias de CFA dentro de grupo genético (Figura 2). Imagens representativas de oócitos maturados, não maturados, apoptóticos e não apoptóticos são apresentadas nas Figuras 3 e 4.

Nenhuma diferença foi observada na atividade mitocondrial (G1: 11,79 $\pm$ 3,44 vs G2: 14,84 $\pm$ 3,96; $P > 0,05$) e na produção de EROS (G1: 14,02 $\pm$ 2,91 vs G2: 15,46 $\pm$ 3,15; $P > 0,05$) de oócitos coletados de vacas do G1 e do G2. No entanto, oócitos coletados de vacas de baixa CFA do G1 apresentaram maior atividade mitocondrial ($P < 0,05$) e maior produção de EROS ($P < 0,0001$) em comparação com os coletados de vacas de alta CFA do mesmo grupo. No G2, a atividade mitocondrial não diferiu entre oócitos coletados de vacas de baixa e de alta CFA ($P > 0,05$), mas a produção de EROS foi maior nos oócitos coletados de vacas de baixa CFA ($P < 0,05$; Tabela 2). Imagens representativas de oócitos corados para avaliação de atividade mitocondrial e EROS são apresentadas nas Figuras 5 e 6.

Entre as enzimas antioxidantes analisadas no fluido folicular, a atividade da GPx diferiu entre os grupos G1 e G2 ($P < 0,05$). As fêmeas do G1 apresentaram menor atividade da GPx (0,0185 $\pm$ 0,0016 UI/mg proteína/mL) em comparação àquelas do G2 (0,0258 $\pm$ 0,0018 UI/mg proteína/mL). A atividade da enzima SOD tendeu a ser menor nas vacas do G1, em comparação com as do G2 (0,2001 $\pm$ 0,01598 vs 0,2427 $\pm$ 0,01582 UI/mg proteína/mL; $P < 0,07$). A atividade da catalase não diferiu entre vacas dos grupos G1 e G2 (0,004590 $\pm$ 0,000701 vs 0,004652 $\pm$ 0,000552 $P > 0,05$). A atividade das enzimas antioxidantes não diferiu entre vacas de baixa e alta CFA dentro de cada grupo genético (GPx; SOD; CAT: $P > 0,05$; Figura 7).

397 **Discussão**

398 A CFA é uma característica determinada principalmente por fatores genéticos,
399 sendo estabelecida ainda durante a fase fetal, quando ocorre a formação da reserva de
400 folículos primordiais. Além disso, variações individuais, subespécies e a herdabilidade
401 relativamente alta influenciam diretamente se uma fêmea será classificada como de alta
402 ou baixa CFA (Ireland et al., 2008; Mossa et al., 2012). Neste estudo, vacas com alta CFA
403 apresentaram maior número de COCs recuperados, corroborando os achados de Ireland
404 et al. (2008), Cushman et al. (2009), Silva-Santos et al. (2014) e Rosa et al. (2018).
405 Ademais, como observado neste estudo, maior número de COCs recuperados em animais
406 de alta CFA também foi relatado por Garcia et al. (2020b), em um estudo com vacas
407 mestiças girolando (*Bos taurus* × *Bos indicus*). Segundo os autores, vacas mestiças de alta
408 CFA possuem maior eficiência para a PIVE. Dessa forma, os resultados deste estudo
409 reforçam que a CFA é um indicador funcional da reserva ovariana em bovinos, refletindo
410 em maior eficiência nos protocolos de aspiração folicular. Neste sentido, a CFA pode ser
411 considerada mais como um marcador individual do que populacional.

412 Por outro lado, embora o número de COCs seja maior em vacas de alta CFA, isso
413 não garante automaticamente maior qualidade oocitária ou competência de
414 desenvolvimento embrionário, o que exige avaliação integrada de qualidade morfológica,
415 competência nuclear e estado redox. Em nosso estudo, a qualidade morfológica dos
416 COCs, avaliada pela proporção de COCs viáveis e degenerados, não diferiu entre vacas
417 com baixa ou alta CFA. Assim, embora o número absoluto de COCs e de COCs viáveis
418 seja maior em vacas de alta CFA, estudos anteriores também mostraram que a proporção
419 de oócitos de alta qualidade aspirados de folículos antrais é similar entre vacas com alta
420 e com baixa CFA (Ireland et al. 2007). Da mesma forma, Ireland et al. (2008) observaram

um número de cinco vezes mais oócitos viáveis coletados de ovários bovinos com alta CFA (≥ 25 folículos) do que com baixa CFA (≤ 15 folículos), mas não observaram diferença na proporção de oócitos viáveis entre as categorias. Segundo os autores, este resultado pode ser explicado pela alta taxa de crescimento e atresia folicular apresentada pelo grupo de alta CFA.

Foi observado, porém, que vacas 3/4 e 7/8 HG (G2) apresentaram maior porcentagem de COCs degenerados, possivelmente devido à maior composição genética taurina e sua maior suscetibilidade ao estresse térmico. Fatores ambientais, como temperatura e umidade elevadas, associados à nutrição e produção de leite, podem impactar negativamente a qualidade oocitária (Sartori et al., 2002; Wolfenson & Roth, 2019). De fato, Rocha et al. (1998) observaram queda acentuada na qualidade de oócitos de vacas holandesas no verão e Silva (2020) observou maior proporção de oócitos viáveis coletados de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) do que de vacas holandesas no verão. O presente trabalho foi conduzido nos meses de agosto a outubro, quando o ITU médio foi de $72,90 \pm 0,86$. Em um estudo conduzido com vacas mestiças, Azevedo et al. (2005) observaram que animais 1/2, 3/4 e 7/8 HZ aumentaram a frequência respiratória a partir de um ITU de 63, 61 e 60, e aumentaram a temperatura retal a partir de um ITU de 72, 67 e 63, respectivamente. Desta forma, é possível que as vacas do G2 estivessem sob estresse térmico por calor no período de desenvolvimento do estudo.

O presente estudo indica que oócitos de vacas com baixa CFA estavam, possivelmente, submetidos a condições de estresse oxidativo, conforme sugerido pelo acúmulo de EROS. Ademais, o acúmulo de EROS nos oócitos de vacas de baixa CFA, tanto do G1 quanto do G2, não foi acompanhado por aumento detectável na atividade das

enzimas antioxidantes no fluido folicular, sugerindo uma resposta antioxidante menos eficiente nos animais com baixa CFA. Esses resultados sugerem que o microambiente folicular de vacas com baixa CFA é mais suscetível ao dano oxidativo, o que pode ter implicações negativas para a qualidade oocitária e competência de desenvolvimento embrionário. Além disso, maior proporção de oócitos apoptóticos nas vacas de baixa CFA em comparação às de alta CFA, tanto no G1 (65 vs 32%), quanto no G2 (35 vs ~0 %), ainda que não significativo, reforça a nossa hipótese de que a baixa CFA pode estar associada a um ambiente folicular menos eficiente na regulação redox, favorecendo a ativação de vias apoptóticas.

A expressão de AMH pelas células da granulosa e a presença de receptores de FSH nestas células regulam o recrutamento e a sobrevivência folicular (Dewailly et al., 2014). Em níveis mais baixos de AMH, os folículos primordiais são recrutados mais rápido, diminuindo sua qualidade de uma forma mais rápida. Outras ações deste hormônio incluem redução da sensibilidade do folículo ao FSH *in vivo* e inibição do crescimento pré-antral induzido por FSH (Durlinger et al., 2001). Dessa forma, é possível que vacas com alta CFA apresentem um microambiente folicular mais estável e funcional, com maior expressão de AMH e regulação mais eficiente da foliculogênese, o que contribui para menor ativação folicular precoce, melhor sincronização do crescimento antral, e menor exposição dos oócitos ao estresse oxidativo durante o desenvolvimento. Esses mecanismos podem explicar o melhor *status* antioxidante observado nos COCs de vacas de alta CFA, incluindo menor acúmulo de EROS.

Durante a MIV, os oócitos apresentam elevada demanda energética, suprida principalmente pelas mitocôndrias por meio da produção de ATP (Soto-Heras e Paramio,

2020), o que justifica a abundância dessas organelas nos COCs (Keane e Ealy, 2024). No presente estudo, foi observada maior atividade mitocondrial após a MIV em oócitos de vacas com baixa CFA do G1, o que pode ter contribuído para a maior produção de EROS nesses animais, visto que as mitocôndrias são uma das principais fontes de radicais livres (Morado et al., 2009; Barros et al., 2019). Diferentemente de nossos achados, Nagai et al. (2016) observaram que a atividade mitocondrial após a MIV foi similar em oócitos coletados de vacas com alta e com baixa CFA. Os autores relataram ainda redução do acúmulo de EROS após a MIV em comparação ao observado em COCs imaturos, sugerindo a ativação de mecanismos antioxidantes tanto em vacas de alta quanto em vacas de baixa CFA. A capacidade antioxidante intrínseca dos oócitos foi também discutida por Cetica et al. (2001), que observaram aumento da atividade da enzima SOD em COCs maturados, reforçando o papel dos mecanismos endógenos de defesa celular contra o estresse oxidativo.

No presente estudo, apesar da impossibilidade de mensurar diretamente a atividade antioxidante nos oócitos devido ao número reduzido de COCs obtidos, foi observada atividade elevada de GPx e SOD no fluido folicular das vacas do G2, grupo com maior composição genética taurina. A ausência de acúmulo de EROS nos oócitos dessas vacas sugere que o sistema antioxidante folicular foi mais eficiente na neutralização de radicais livres, demonstrando uma resposta adaptativa aumentada ao estresse oxidativo.

Neste estudo, não foram observadas diferenças nas proporções de oócitos maturados entre vacas do G1 e do G2 e entre vacas de alta e de baixa CFA. Diferente de nossos resultados, estudos como os de Nagai et al. (2016) e Sakaguchi et al. (2018)

apontaram para maior taxa de maturação de COCs provenientes de ovários de vacas holandesas de alta CFA, sugerindo que as células da granulosa, que são responsáveis pela retomada meiótica através das junções comunicantes, de bovinos com alta CFA podem exercer esta função de forma mais apropriada.

Em resumo, os dados deste estudo destacam a importância da interação entre CFA e o *status* oxidativo do oócito e do fluido folicular. Estudos futuros são necessários para aprofundar a compreensão das vias moleculares envolvidas na interação entre CFA, estresse oxidativo e competência oocitária, considerando diferentes composições genéticas.

Conclusão

Este estudo demonstrou que vacas com alta CFA apresentaram maior número de COCs recuperados, independentemente do grupo genético. No entanto, não foram observadas diferenças na qualidade morfológica dos oócitos entre as categorias de CFA, sugerindo que a quantidade folicular não está necessariamente associada à qualidade morfológica dos COCs.

Do ponto de vista metabólico, os oócitos de vacas com baixa CFA apresentaram maior acúmulo de EROS, sugerindo menor capacidade antioxidante e maior exposição ao estresse oxidativo. Em contrapartida, vacas com maior proporção de sangue europeu apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD no fluido folicular, o que indica um sistema antioxidante mais eficiente.

Referências

- Aebi, H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology - Oxygen Radicals in Biological Systems* **105**, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Azevedo M de, Pires, MFA, Saturnino, HM, Lana, AMQ, Sampaio, IBM, Monteiro JBN, Morato, LE (2005) Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **34**, 2000-2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982005000600025>.
- Barros FDA, Adona PR, Guemra S, Damião BCM (2019) Oxidative homeostasis in oocyte competence for in vitro embryo development. *Animal Science Journal* **90**, 1343-1349. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.13256>.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Broi MG da, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro, PA (2018) Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics* **35**, 735-751. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT (2001) Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* **51**, 57-64. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540119253>.

- 531 Chazotte B (2011) Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harbor*
 532 *Protocols*, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5648>.
- 533 Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC (2009)
 534 Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows:
 535 investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *Journal of*
 536 *Animal Science* **87**, 1971-1980. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1728>.
- 537 Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G,
 538 Kelsey TW, Lamarca A, Lambalk C, Mason H, Nelson SM, Visser JA, Wallace WH,
 539 Anderson RA (2014) The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in
 540 women. *Human Reproduction Update* **20**, 370-385.
 541 <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmt062>.
- 542 Durlinger ALL, Gruijters, MJG, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM,
 543 Jong FH, Uilenbroek J TJ, Grootegoed JA, Themmen AP (2001) Anti-Müllerian hormone
 544 attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*
 545 **142**, 4891-4899. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.11.8486>.
- 546 Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith
 547 GW, Ireland JJ (2012) Effects of maternal environment during gestation on ovarian
 548 folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in*
 549 *Domestic Animals* **47**, 31-37. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>.
- 550 Garcia SM, Morotti F, Cavalieri FLB, Lunardelli PA, Santos AO, Membrieve CMB,
 551 Castilho C, Puelker RZ, Silva JOF, Zangirolamo AF, Seneda MM (2020a)
 552 Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo

- 553 production in cows with large antral follicle counts. *Animal Reproduction Science* **221**.
 554 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106601>.
- 555 Garcia SM, Lunardelli P, Anciotto KL, Oliveira, EC de, Bergamo, LZ, Zangirolamo AF,
 556 Seneda MM (2020 b) Effect of the antral follicle count of *Bos taurus* × *Bos indicus* dairy
 557 cows on in vitro embryo production. *Semina: Ciências Agrárias* **41**, 2171-2178.
 558 <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5supl1p2171>.
- 559 Grala TM, Price MD, Kuhn-Sherlock B, Burke CR, Meier S (2021) Investigating
 560 anogenital distance and antral follicle count as novel markers of fertility within a herd of
 561 cows with positive or negative genetic merit for fertility traits. *Journal of Dairy Science*
 562 **104**, 12939-12952. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-19948>.
- 563 Gupta S, Choi A, Yu HY, Czerniak SM, Holick EA, Paoletta LJ, Agarwal A, Combelles
 564 CMH (2011) Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen
 565 peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reproduction, Fertility*
 566 *and Development* **23**, 673-680. <http://dx.doi.org/10.1071/rd10270>.
- 567 Günzler WA, Steffens GJ, Grossmann A, Kim SMA, Ötting F, Wendel A, Flohé L (1984)
 568 The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift*
 569 *Für Physiologische Chemie* **365**, 195-212.
 570 <http://dx.doi.org/10.1515/bchm2.1984.365.1.195>.
- 571 Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO
 572 (2007) Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely
 573 correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after

- 574 ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* **22**, 1687-1695.
 575 <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dem071>.
- 576 Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith
 577 GW, Perez, G.I., Evans ACO, Ireland JJ (2008) Antral follicle count reliably predicts
 578 number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle.
 579 *Biology of Reproduction* **79**, 1219-1225.
 580 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>.
- 581 Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger J K, Ireland JLH, Mossa F,
 582 Lonergan P, Evans ACO (2011) Does size matter in females? An overview of the impact
 583 of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-
 584 Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the
 585 ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **23**, 1-14.
 586 [10.1071/RD10226](http://dx.doi.org/10.1071/RD10226).
- 587 Madesh M, Balasubramanian KA (1997) Activation of liver mitochondrial phospholipase
 588 A2 by superoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **346**, 187-192.
 589 <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1997.0288>.
- 590 Keane JA, Ealy AD (2024) An overview of reactive oxygen species damage occurring
 591 during in vitro bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant
 592 use to limit these adverse effects. *Animals* **14**, 330.
 593 <http://dx.doi.org/10.3390/ani14020330>.
- 594 Marei WFA, Bie J de, Xhonneux I, Andries S, Britt JH, Leroy JLMR (2022) Metabolic
 595 and antioxidant status during transition is associated with changes in the granulosa cell

- transcriptome in the preovulatory follicle in high-producing dairy cows at the time of breeding. *Journal of Dairy Science*, **105**, 6956-6972. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2022-21928>.
- Morado AS, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC (2009) Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, **21**, 608-614. <http://dx.doi.org/10.1071/rd08198>.
- Moretti R (2016) Influência da contagem de folículos antrais sobre as taxas de concepção e prenhez em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à sincronização da ovulação. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina, 1-28.
- Nagai K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M (2016) 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*, **37**, 63-71. <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.37.63>.
- Rocha A, Randel R.D, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W (1998) High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in but not in cows. *Theriogenology*, **49**, 657-665. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00016-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00016-8).
- Rosa CO, Marinho LSR, Rosa PRA, Cesaro MP, Lunardelli PA, Silva-Santos KC, Basso AC, Bordignon V, Seneda MM (2018) Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral

- 617 follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, **53**, 921-929.
 618 <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13189>.
- 619 Roth Z (2018) Symposium review: reduction in oocyte developmental competence by
 620 stress is associated with alterations in mitochondrial function. *Journal of Dairy Science*,
 621 **101**, 3642-3654. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13389>.
- 622 Roth Z, Hansen PJ (2004) Involvement of apoptosis in disruption of developmental
 623 competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*,
 624 **71**, 1898-1906. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.031690>.
- 625 Sakaguchi K, Tanida T, Abdel-Ghani MA, Kanno C, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano
 626 M (2018) Relationship between the antral follicle count in bovine ovaries from a local
 627 abattoir and steroidogenesis of granulosa cells cultured as oocyte-cumulus-granulosa
 628 complexes. *Journal of Reproduction and Development*, **64**, 503-510.
 629 <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2018-080>.
- 630 Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC (2002)
 631 Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer
 632 and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, **85**, 2803-2812.
 633 [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74367-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74367-1).
- 634 Seneda MM, Morotti F, Bergamo LZ, Costa CB, Rosenthal R, Sarapião FD, Silva NC,
 635 Appolonio E (2016). Diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que podem impactar a
 636 eficiência das biotécnicas da reprodução. In: 7° *Simpósio internacional de reprodução*
 637 *aplicada*, 34-53.

638 Silva, DR da (2020) Qualidade de oócitos de vacas leiteiras e produção de embriões a
 639 partir de oócitos maturados *in vitro* com melatonina. 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado)
 640 - Curso de Programa de Pósgraduação em Ciências Veterinárias, Medicina Veterinária,
 641 Universidade Federal de Lavras, Lavras.

642 Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz JC, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano
 643 MR, Oliveira RI, Lima DCM, Seneda MM (2014) Antral follicle populations and embryo
 644 production – in vitro and in vivo – of *Bos indicus–taurus* donors from weaning to yearling
 645 ages. *Reproduction in Domestic Animals*, **49**, 228-232.
 646 <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12255>.

647 Soto-heras S, Paramio M (2020) Impact of oxidative stress on oocyte competence for in
 648 vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, **132**, 42-350.
 649 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>

650 Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt Jr JHF, Lesch TN (1982) A
 651 dairy cow body condition scoring system and its relationship to standard production
 652 characteristics. *Journal of Dairy Science*, **65**, 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)8222)
 653 0302 (82)8222

654 Wolfenson D, Roth Z (2018) Impact of heat stress on cow reproduction and
 655 fertility. *Animal Frontiers*, **9**, 32-38, <http://dx.doi.org/10.1093/af/vfy02>.

656

Figura 1 - Cronograma de aspiração folicular (OPU) para coleta de complexos cumulus-oócitos e fluido folicular (FOL) de vacas dos grupos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG). As vacas foram distribuídas em dois grupos para OPU, de modo a garantir a presença de animais de todos os cruzamentos em cada dia de aspiração.

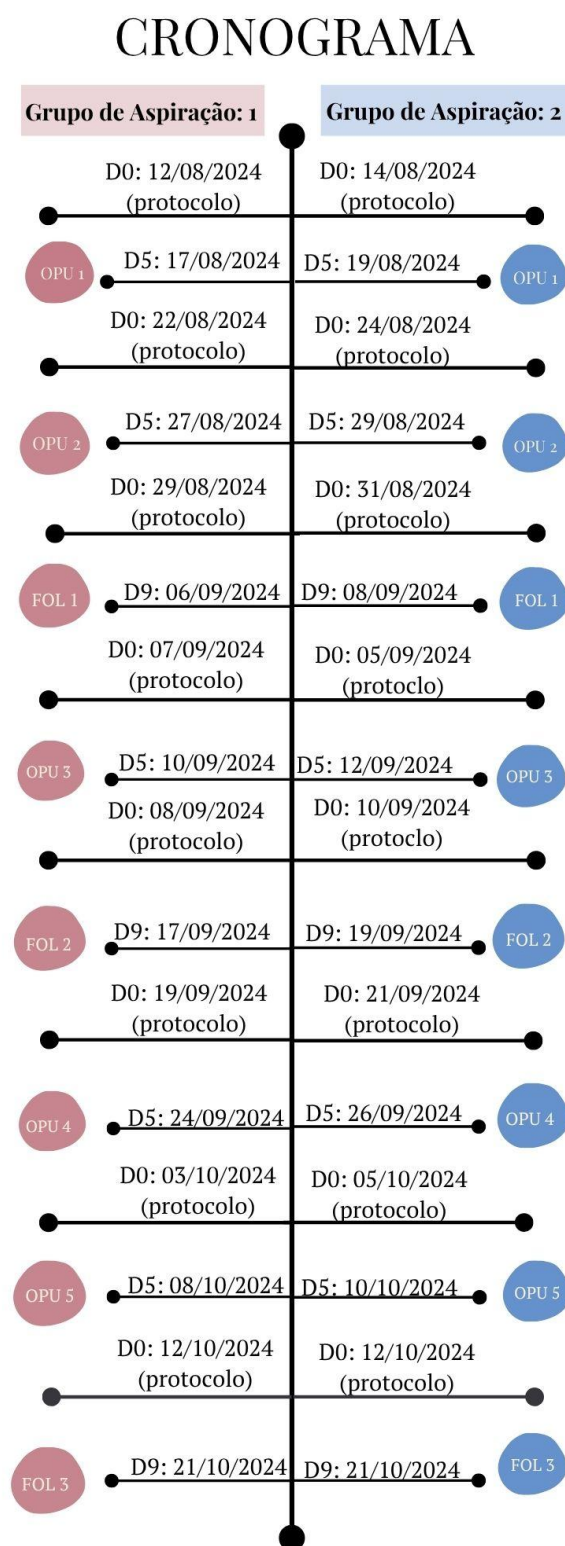
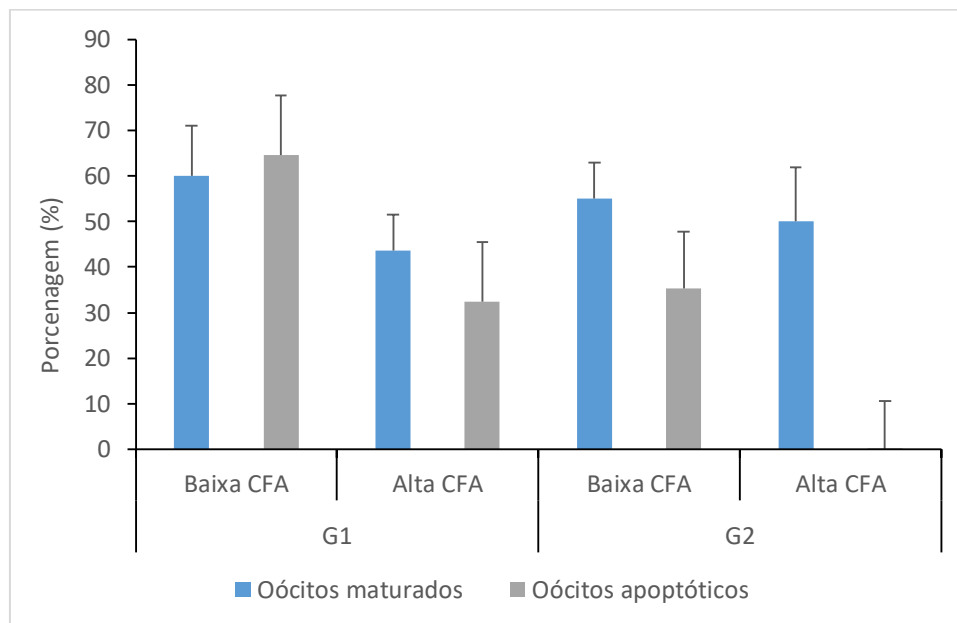


Tabela 1 - Número de folículos, número de complexos cumulus-oócito (COCs), número de COCs viáveis e porcentagem de COCs viáveis e degenerados recuperados de vacas com baixa e com alta contagem de folículos antrais nos grupamentos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG).

Variável	G1		<i>P</i> <i>Valor</i>	G2		<i>P Valor</i>
	Baixa CFA	Alta CFA		Baixa CFA	Alta CFA	
Total de folículos (n)	15,54 ± 1,53b	26,81 ± 3,61a	0,0075	11,29±1,05b	24,60 ± 2,53a	<0,0001
COCs recuperados (n)	5,49 ± 1,00b	10,43 ± 2,59a	0,0361	2,65±0,48b	8,08±1,55a	<0,0001
COCs viáveis (n)	5,38 ± 0,72	6,99 ± 1,08	-	2,69 ± 0,81	6,17 ± 0,83	0,0170
COCs viáveis (%)	71,65 ± 6,04	58,42 ± 8,47	-	72,50 ± 12,00	66,65 ± 6,41	-
COCs degenerados (%)	23,10 ± 4,00	26,40 ± 5,20	-	41,60 ± 7,90	32,20 ± 4,24	-

^{ab} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre vacas de baixa e de alta CFA dentro de grupo genético.

Figura 2 - Porcentagem de oócitos maturados e apoptóticos em vacas com alta e baixa contagem folicular antral nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG).



Não foram observadas diferenças entre vacas de alta e baixa CFA dentro de grupo genético ($P > 0,05$).

Tabela 2- Atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ambas expressas em unidades arbitrárias (UA), em oócitos de vacas com baixa e alta contagem folicular antral nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG).

	<i>G1</i>		<i>P</i> <i>Valor</i>	<i>G2</i>		<i>P</i> <i>Valor</i>
	Baixa CFA	Alta CFA		Baixa CFA	Alta CFA	
Atividade mitocondrial (UA)	19,56 ± 6,17b	7,11 ± 2,75a	0,0127	16,92 ± 5,45a	13,00 ± 4,07a	0,4453
Produção de EROS (UA)	38,98 ± 10,59a	5,04 ± 1,68b	<0.0001	26,52 ± 8,19a	9,01 ± 2,36b	0,0081

^{Ab} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística entre vacas de alta e de baixa CFA dentro de grupo genético.

Figura 3 - Imagens representativas de oócitos mostrando DNA corado em azul sob coloração com DAPI. (A) oócito não maturado. (B) oócito maturado em que é possível observar o núcleo e o primeiro corpúsculo polar.

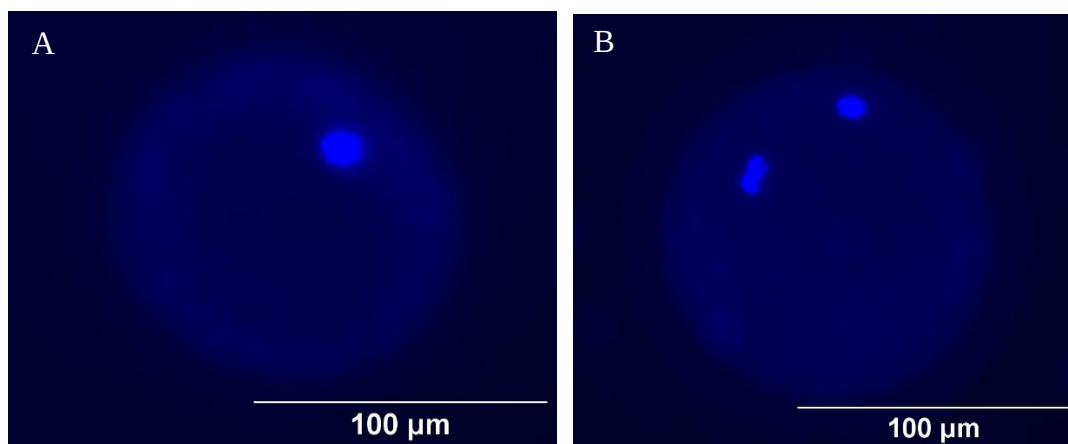


Figura 4 - Oócitos apoptóticos e não apoptóticos observados após o ensaio de TUNEL em oócitos bovinos. (A) oócito não apoptótico. (B) oócito apoptótico em que o DNA foi corado em verde.

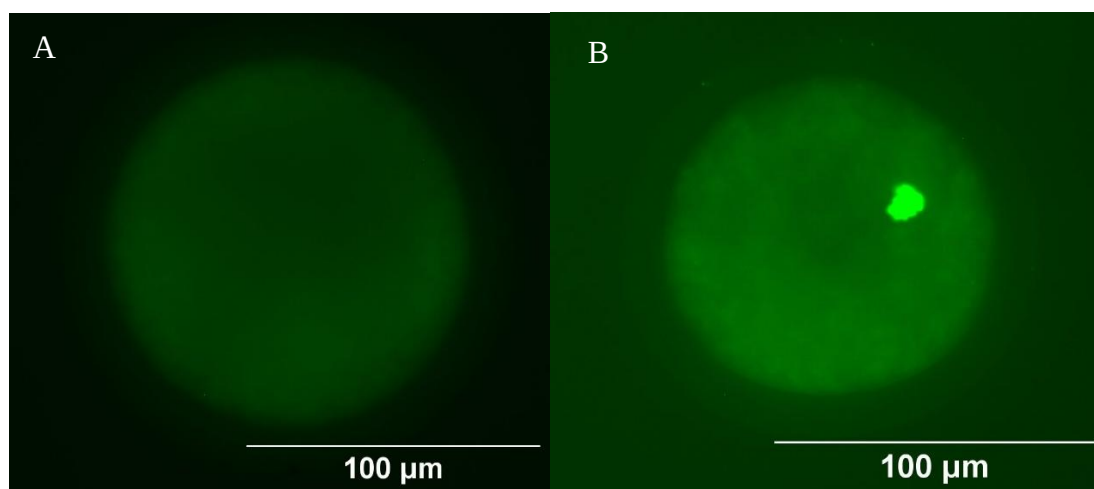


Figura 5 - Oócitos sob coloração para identificação de atividade mitocondrial por unidades arbitrárias (UA). (A) maior atividade mitocondrial (35,27 UA). (B) menor atividade mitocondrial (14,69 UA).

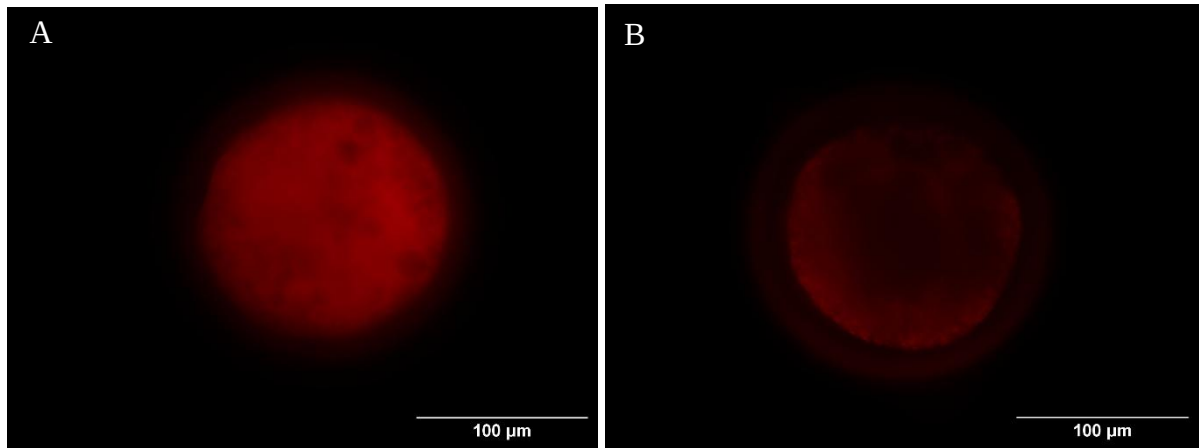


Figura 6 - Oócitos sob coloração para identificação de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), expressa em unidades arbitrárias (UA). (A) maior produção de EROS (32,81 UA). (B) menor produção de EROS (9,46 UA).

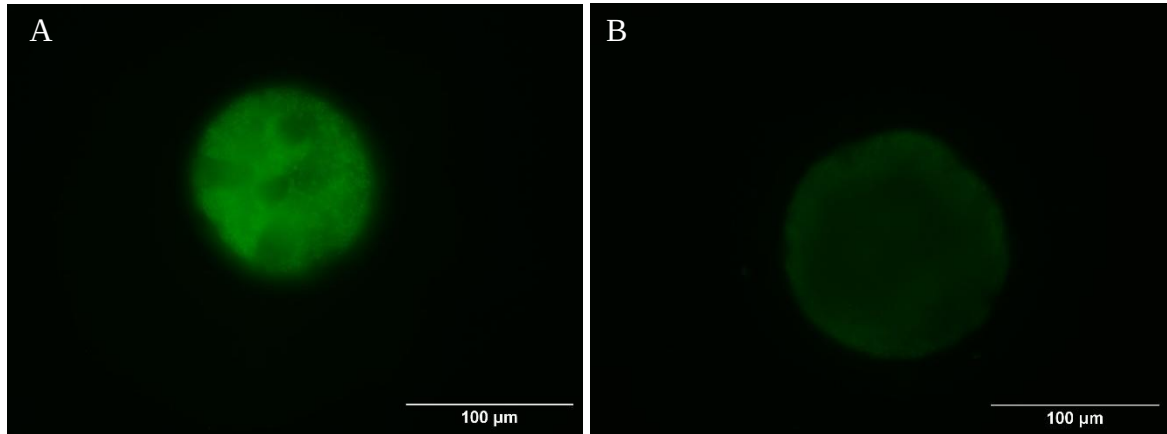
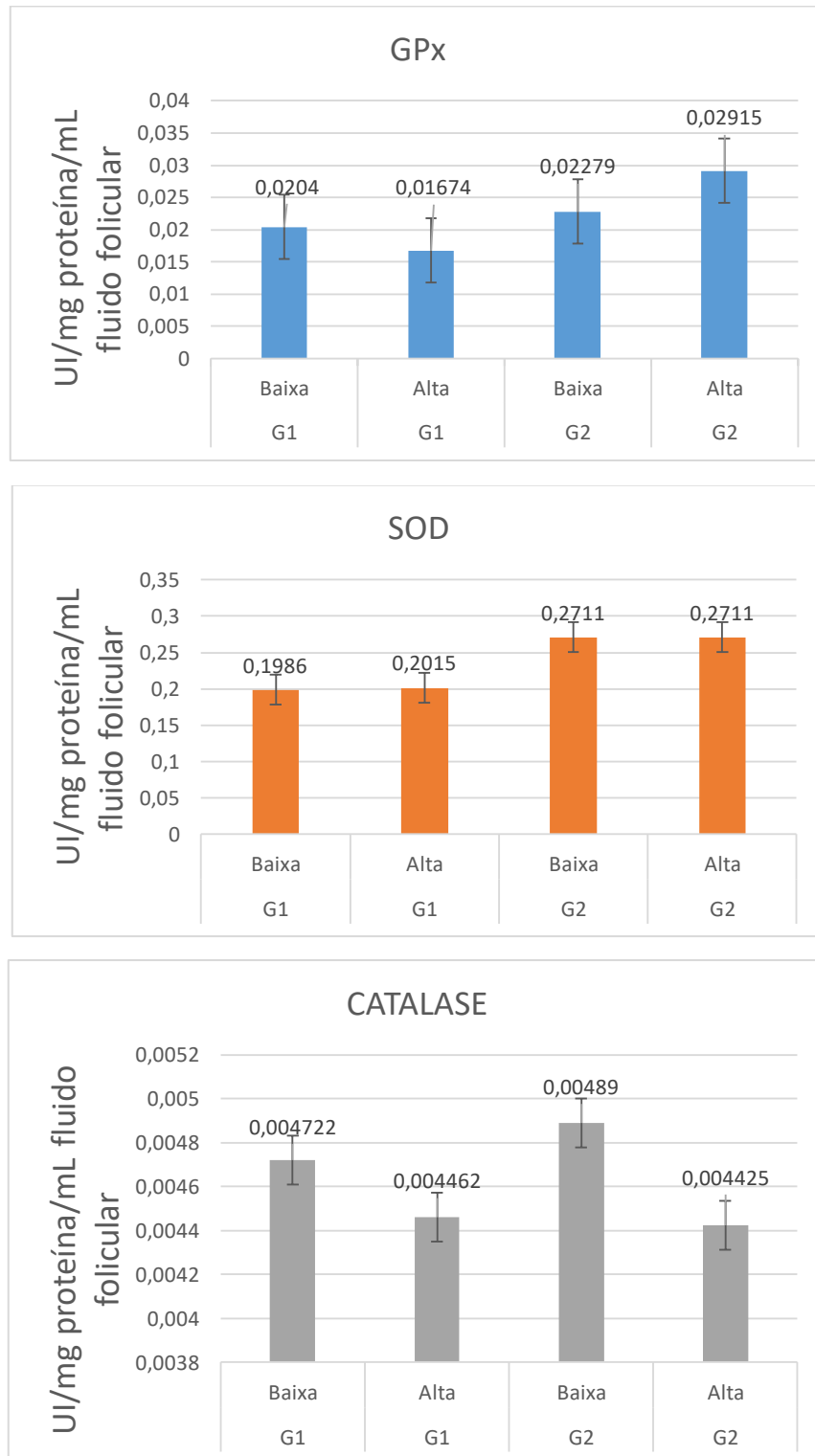


Figura 7: Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase no fluido folicular de vacas com baixa e alta contagem de folículos antrais nos grupos genéticos G1 (1/2+5/8 HG) e G2 (3/4 + 7/8 HG).



Não foram observadas diferenças entre vacas de alta e baixa CFA dentro de grupo genético ($P > 0,05$).