UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DO MOMENTO DA ONDA FOLICULAR SOBRE POTENCIAIS PREDITORES DE FERTILIDADE E SUAS REPETIBILIDADES EM NOVILHAS PRÉ-PÚBERES *Bos indicus* (NELORE) E *Bos taurus* (CARACU)

Júlia Ribeiro Bevilaqua

Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DO MOMENTO DA ONDA FOLICULAR SOBRE POTENCIAIS PREDITORES DE FERTILIDADE E SUAS REPETIBILIDADES EM NOVILHAS PRÉ-PÚBERES *Bos indicus* (NELORE) E *Bos taurus* (CARACU)

Discente: Júlia Ribeiro Bevilaqua

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal.

2022

B571e

Bevilaqua, Júlia Ribeiro

Efeito do momento da onda folicular sobre potenciais preditores de fertilidade e suas repetibilidades em novilhas pré-púberes Bos indicus (Nelore) e Bos taurus (Caracu) / Júlia Ribeiro Bevilaqua. -- Jaboticabal, 2022

73 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Fabio Morato Monteiro

1. Reprodução. 2. Bovinos. 3. Folículo ovariano. 4. Ultrassonografia veterinária. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO MOMENTO DA ONDA FOLICULAR SOBRE POTÊNCIAIS DE PREDITORES DE FERTILIDADE E SUAS REPETIBILIDADES EM NOVILHAS PRÉ-PÚBERES *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Caracu)

AUTORA: JULIA RIBEIRO BEVILAQUA
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Reproducao Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO MARCONDES SENEDA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínicas Veterinárias / Universidade Estadual de Londrina

Jaboticabal, 22 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Júlia Ribeiro Bevilaqua, nascida no dia 15 de fevereiro de 1997, no município de Ribeirão Preto – SP. É Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal – SP (2020). Foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de outubro de 2017 a setembro de 2018, sob orientação da Profª. Drª. Maria Emilia Franco Oliveira. Realizou estágios durante a graduação em instituições de pesquisa como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP), atuando com Biotecnologias Reprodutivas e Melhoramento Genético Animal. Na mesma instituição em que se graduou, ingressou no Mestrado (2020) em Medicina Veterinária, com ênfase em Reprodução Animal, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo Fernando Bevilaqua e Cláudia Ribeiro, por serem meus exemplos e a minha base para a vida;

Ao meu namorado, Giovane Gonçalves Penasso, pelo apoio e compreensão ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, por esta experiência e por ter me dado força e fé para superar cada desafio.

Aos meus pais, Cláudia e Paulo, por todo amor e carinho, que nunca mediram esforços para me apoiar durante todas as etapas da minha vida. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e ainda fazem para tornar os meus sonhos possíveis. Amo vocês!

Ao meu namorado, Giovane, pelo companheirismo, parceria, incentivo, amor e paciência comigo durante todos esses anos. Obrigada por tanto, eu amo você!

Aos meus avós, Maria Lúcia, João, Carmen e José Paulo. Por todo carinho, ensinamentos e conselhos.

Aos meus familiares que, mesmo distantes, se fizeram presentes e demonstraram apoio nessa etapa.

À minha orientadora, Profª. Drª. Maria Emilia Franco Oliveira, por me orientar desde a graduação não só na vida profissional, mas também na pessoal. Obrigada por ser um exemplo e uma inspiração de profissional e pessoa para mim.

Aos professores, Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro e Profª. Drª. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, por todo auxílio e disponibilidade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, Naiara, Maria Amélia, Marina, Marcelo e Luana. Sem a ajuda de vocês este experimento jamais teria acontecido.

Aos meus amigos de longa data, Laura, Letícia, Rafaella, Giovana, Ana Paula e Gabriel. Obrigada pelo suporte e paciência ao longo desses anos.

A todos os funcionários do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho/SP que, de alguma forma, participaram e tornaram possível a realização deste estudo.

Ao programa de pós-graduação da UNESP/FCAV e à CAPES pela bolsa concedida.

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

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ii
RESUMO iii
ABSTRACT iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. Dinâmica folicular ovariana de novilhas pré-púberes 4
2.2. Contagem de Folículos Antrais (CFA) 7
2.2.1. Causas das variações da CFA entre os indivíduos 7
2.2.2. Repetibilidade da CFA 9
2.2.3. Padrões hormonais e a CFA 11
2.2.4. CFA e fertilidade 13
2.3. Outros potenciais preditores de fertilidade 17
2.3.1. Biometria ovariana 17
2.3.2. Biometria, ecogenicidade e ecotextura uterina 19
2.3.3. Morfometria da genitália externa 21
3. REFERÊNCIAS 23
CAPÍTULO 2 – EFFECT OF FOLLICULAR WAVE STAGE ON POTENTIAL FERTILITY PREDICTORS AND ITS REPEATABILITY COEFFICIENT IN *Bos indicus* (NELLORE) AND *Bos taurus* (CARACU) PREPUBERTAL HEIFERS 34
ABSTRACT 34
1. INTRODUCTION 35
2. MATERIAL AND METHODS 37
2.1 Location, animals, and management 37
2.2 Experimental design 38
2.2.1 Vulvar morphometry 38
2.2.2 Ultrasound evaluations 39
2.3 Statistical analysis 40
3. RESULTS 41
4. DISCUSSION 42
5. REFERENCES 50

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Potenciais preditores de eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas Nelore e Caracu submetidas a estação de monta natural"**, protocolo nº 015953/18, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Maria Emília Franco Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de novembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/03/2019 a 06/05/2022
Espécie / Linhagem	*Bos taurus* / *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*
Nº de animais	1470
Peso / Idade	230 a 500 kg / 20 a 120 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Instituto de Zootecnia – Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica

Jaboticabal, 08 de novembro de 2018.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

EFEITO DO MOMENTO DA ONDA FOLICULAR SOBRE POTENCIAIS PREDITORES DE FERTILIDADE E SUAS REPETIBILIDADES EM NOVILHAS PRÉ-PÚBERES *Bos indicus* (NELORE) E *Bos taurus* (CARACU)

RESUMO – O estudo foi delineado para avaliar o efeito dos momentos da onda folicular (emergência e dominância) e a repetibilidade de potenciais preditores de fertilidade (morfometria vulvar, biometria, ecogenicidade e ecotextura uterina, biometria ovariana e contagem de folículos antrais – CFA) em novilhas pré-púberes de subespécies diferentes. Novilhas Nelore (n = 30) e Caracu (n = 28) foram submetidas a uma sequência de onze avaliações a cada 48 horas (D0 – dia aleatório da onda folicular antral, até D20) para estudar os potenciais preditores de fertilidade em condições naturais. Os dados obtidos foram comparados de acordo com a raça e o momento da onda folicular. A análise estatística incluiu efeitos fixos de dias de avaliação, raças e sua interação estatística, e foi realizada pelos procedimentos MIXED, GENMOD, GLM e CORR do programa estatístico SAS ($P < 0,05$). Os coeficientes de repetibilidade e as correlações de Pearson das variáveis também foram calculados. A raça mostrou influenciar a altura de rima, a área ovariana e a CFA, que foram maiores nas novilhas Nelore ($P < 0,02$). O momento da onda folicular também influenciou a maioria das avaliações, com destaque para a CFA, que se mostrou maior na presença de folículo dominante (FD) em ambas as raças ($P < 0,0001$). O coeficiente de repetibilidade foi considerado alto para a largura vulvar (0,76 e 0,66), a área ovariana (0,70 e 0,62) e a CFA (0,76 e 0,74) nas raças Nelore e Caracu, respectivamente. Apenas a biometria ovariana foi capaz de predizer a CFA (valores das correlações de Pearson acima de 0,66; $P < 0,0001$) em novilhas pré-púberes. Os resultados descritos mostram que, mesmo influenciados pelo momento da onda folicular e pela raça, uma única medida ao longo da pré-puberdade da maioria dos preditores de fertilidade é suficiente para caracterizar novilhas pré-púberes.

Palavras-chave: *Bos indicus*, *Bos taurus*, CFA, onda folicular, pré-puberdade, repetibilidade.

EFFECT OF FOLLICULAR WAVE MOMENT ON POTENTIAL FERTILITY PREDICTORS AND ITS REPEATABILITY OF *Bos indicus* (NELLORE) AND *Bos taurus* (CARACU) PREPUBERTAL HEIFERS

ABSTRACT – The study evaluated the effects of follicular wave moments (emergence and dominance) and the repeatability of potential fertility predictors (vulvar morphometry, uterine biometry, echogenicity and echotexture, ovarian biometry and antral follicle count – AFC) in two purebred prepubertal heifers. Nellore (n = 30) and Caracu (n = 28) heifers were submitted to a sequence of eleven evaluation days conducted every 48 hours (D0 – random day of the antral follicular wave, until D20) to study the potential fertility indicators under natural conditions. The data obtained were compared according to breed and to follicular wave moment. Statistical analysis included fixed effects of breeds, evaluation days and their statistical interaction, being performed by MIXED, GENMOD, GLM and CORR procedures of the SAS statistical program ($P < 0.05$). Repeatability coefficients and Pearson's correlations of the variables were also calculated. Breed was shown to influence rima height, ovarian area and AFC, which were greater in Nellore heifers ($P < 0.02$). The follicular wave moment also influenced most of the evaluations, highlighting the AFC, which showed to be greater in the dominant follicle (DF) presence in both breeds ($P < 0.0001$). The repeatability coefficient was considered high for vulva width (0.76 and 0.66), ovarian area (0.70 and 0.62) and AFC (0.76 and 0.74) for Nellore and Caracu breeds, respectively. Only ovarian biometry was able to predict AFC (Pearson's correlations values above 0.66; $P < 0.0001$) in prepubertal heifers. The results described show that, even influenced by follicular wave moment and breed, a single measurement throughout prepuberty of most fertility predictors is sufficient to characterize prepubertal heifers.

Keywords: *Bos indicus*, *Bos taurus*, AFC, follicular wave, prepuberty, repeatability.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de folículos antrais em bovinos é um processo multifatorial, com diferentes níveis de controle endócrinos e locais (Fortune, Rivera e Yang, 2004) que ocorre através de sucessivas ondas foliculares (Pierson e Ginther, 1984; Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989a,b). Estas ondas são iniciadas pela emergência de um grupo de folículos, que resulta na seleção de um folículo dominante, o qual poderá se tornar ovulatório ou atrésico (Fortune, Rivera e Yang, 2004). Estudos em *Bos taurus* relataram a ocorrência de duas a quatro ondas foliculares durante um ciclo estral (Ginther et al., 1989a,b; Knopf et al., 1989; Townson et al. 2002; Sartori et al., 2004), enquanto em fêmeas Nelore foram observados ciclos com duas ou três ondas (Figueiredo et al., 1997; Sartori et al., 2010; Sartori e Barros, 2011).

Em novilhas pré-púberes, semelhante a vacas cíclicas, o recrutamento folicular é precedido por um aumento na liberação de hormônio folículo estimulante (FSH), que promove o crescimento periódico dos folículos em padrão de ondas (Evans et al., 1994a,b) e aumenta gradualmente a sua capacidade de síntese de estradiol (Adams et al., 1992; Bao et al., 1997). No entanto, o mecanismo de *feedback* positivo entre o estradiol e o hormônio luteinizante (LH), que promove a ovulação, não é bem estabelecido nessa categoria, tornando o folículo dominante atrésico e emergindo uma nova onda folicular (Evans et al., 1994a,b; Bergfeldet al., 1994; Honaramooz et al., 2004). As ondas foliculares em novilhas pré-púberes são quantitativamente diferentes das descritas para novilhas púberes (Ginther et al., 1989b), sendo todas anovulatórias (Adams et al., 1994).

Diante do conhecimento a respeito da população e da dinâmica folicular em diferentes categorias e subespécies bovinas, a contagem de folículos antrais (CFA) vem sendo o principal foco de estudos que buscam identificar se tal característica é preditiva do potencial reprodutivo das fêmeas. Tal avaliação, realizada através da identificação e quantificação dos folículos antrais ovarianos (≥ 2 mm) visualizados em

aparelho ultrassonográfico, é considerada um indicador da população folicular em desenvolvimento nos ovários (Baruselli et al., 2015) e do tamanho da reserva ovariana da fêmea (Ireland et al., 2008). É altamente variável entre os indivíduos devido a fatores como a subespécie (Baruselli et al., 2007), a categoria animal (Cardoso et al., 2018) e a idade da fêmea (Cushman et al., 2009). Outros fatores como a genética do animal (Walsh et al., 2014), o ambiente materno, o estado nutricional e a sanidade do rebanho (Ireland et al., 2010; Evans et al., 2012) também parecem influenciar a CFA.

Apesar da indicada variabilidade individual para o número de folículos presentes nos ovários, a CFA possui alta repetibilidade num mesmo animal (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007), o que a torna um recurso estratégico para caracterização e seleção das fêmeas quanto ao seu potencial em recrutar folículos (Morotti et al., 2015). Bovinos com diferentes CFA apresentam características reprodutivas diferentes (Martinez et al., 2016), desde resposta ovariana a tratamentos superovulatórios (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007), concentrações hormonais (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; 2009; Rico et al., 2009; Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2010), taxa de prenhez, intervalo entre partos (Mossa et al., 2012), até a produção de oócitos e embriões (Ireland et al., 2008). No entanto, quanto a este parâmetro em novilhas pré-púberes e sua repetibilidade em diferentes momentos da onda folicular ainda há relatos discordantes (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Gobikrushanth et al., 2017; Morotti et al., 2018), o que justifica a necessidade de pesquisas mais detalhadas a esse respeito.

Embora a CFA seja considerada uma característica fenotípica relacionada à fertilidade da fêmea (Zangirolamo et al., 2018), ainda não é possível estabelecer um único modelo de relação entre tal contagem com o potencial reprodutivo de bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus*. Estudos com rebanhos taurinos têm apontado para melhor desempenho reprodutivo em fêmeas com alta CFA, independente da biotecnologia utilizada. No entanto, pesquisas em animais zebuínos mostraram que a relação entre CFA e desempenho reprodutivo pode ser diferente de acordo com a biotécnica reprodutiva aplicada (Morotti et al., 2015). Além disso, tal característica também é descrita como positivamente associada a medidas indiretas de fertilidade em bovinos (Ireland et al., 2008). Dentre elas, a dosagem da concentração de hormônio anti-mulleriano (AMH) mostrou ser um importante marcador endócrino da população

folicular ovariana (Rico et al., 2009; Cardoso et al., 2018). Tal hormônio é produzido por células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais pequenos (Rico et al., 2011) e, embora seja uma ferramenta segura, o custo para a sua dosagem ainda é a maior limitação do seu uso (Cardoso et al., 2018). Por esta razão, outros preditores de fertilidade têm sido explorados, sobretudo aqueles relacionados ao tamanho das estruturas reprodutivas, considerados de fácil utilização e correlacionados com a população folicular ovariana. Entre eles podemos citar a biometria dos ovários, do útero (Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; Modina et al., 2014; McNeel et al., 2017; Morotti et al., 2018) e morfometria vulvar (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018).

O tamanho dos ovários e a espessura uterina, por exemplo, são bons preditores da reserva folicular ovariana, sendo maiores nas fêmeas com maior CFA (Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; Modina et al., 2014; McNeel et al., 2017; Morotti et al., 2018). As medidas de largura, comprimento e rima vulvar também demonstraram atuar como indicadores da população folicular ovariana e do desempenho reprodutivo, sobretudo de fêmeas zebuínas (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018). Outras modificações morfofuncionais que ocorrem ao longo do ciclo estral também permitem prever a fertilidade bovina, especialmente aquelas que acometem o útero. A avaliação ultrassonográfica uterina aliada a uma análise computadorizada pode ser uma forma diagnóstica não invasiva, prática, acurada e barata (Schmauder et al., 2008). Obtidas com base no número de pixels do órgão (Vrisman et al., 2018), tais variáveis permitem o acesso a informações detalhadas sobre a microestrutura e composição química do tecido (Chandolia et al., 1997), através da determinação da sua ecogenicidade e ecotextura.

Diante do contexto levantado, o presente estudo foi realizado para determinar se os potenciais preditores de fertilidade mencionados (morfometria vulvar, biometria, ecogenicidade e ecotextura uterinas, biometria ovariana e CFA) são repetíveis ao longo das ondas foliculares de novilhas pré-púberes mantidas sob condições reprodutivas naturais, isto é, sem estratégias de controle da atividade ovariana, bem como identificar se tais avaliações são influenciadas pela raça e pelo momento da onda folicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica folicular ovariana de novilhas pré-púberes

A puberdade é um processo gradual de amadurecimento, resultado de uma sequência complexa e integrada de eventos biológicos (Duittoz et al., 2016), definida pelo primeiro estro com ovulação (Rawlings et al., 2003) a partir do qual as fêmeas passam a exibir ciclicidade reprodutiva (Williams e Amstalden, 2010). A idade à puberdade é influenciada por inúmeros fatores, destacando-se a nutrição e o peso corpóreo, conforme revisado por Duittoz et al. (2016). Diferenças entre os grupos genéticos também são observadas: novilhas *Bos indicus* podem atingir a puberdade entre 22 e 36 meses de idade (Nogueira, 2004), ao passo que em fêmeas *Bos taurus* tal fenômeno ocorre mais precocemente, entre 8 e 13 meses de idade (Schams et al., 1981; Dodson et al., 1988; Evans et al., 1992).

Mecanismos endócrinos após o nascimento garantem que a bezerra não ative o sistema reprodutivo até que possua desenvolvimento somático compatível com a reprodução (Semmelmann et al., 2001) e, com base nisso, a hipótese gonadostática sustenta como a puberdade é controlada nessa espécie. Tal teoria estabelece que a fêmea, para tornar-se púbere, deve sofrer redução da sensibilidade hipotalâmica ao *feedback* negativo de estradiol, através da quantidade inferior de receptores deste hormônio no hipotálamo e na hipófise (Day et al., 1987). Esta redução ocorre progressivamente com o amadurecimento da fêmea e permite, assim, o aumento da secreção de gonadotrofinas (Day et al., 1987; Rawlings et al., 2003), sobretudo GnRH, que restabelece a atividade gonadal e dá início ao período de maturidade sexual (Day e Anderson, 1998; Nogueira, 2004).

Segundo Evans et al. (1994b), bezerras Hereford com duas semanas de vida já apresentam o crescimento de folículos antrais em forma de onda. Adams et al. (1994), ademais, observaram aumentos periódicos das concentrações de FSH em novilhas Holandesas que ainda não atingiram a puberdade, mas não de LH. Assim, em fêmeas pré-púberes, semelhante ao que ocorre em cíclicas, o desenvolvimento folicular acontece em padrão de ondas (Evans et al., 1994b), caracterizadas pelas

fases de crescimento, estática e de regressão, e picos periódicos nas concentrações de FSH a cada emergência (Adams e Singh, 2015). No entanto, o mecanismo de *feedback* entre estradiol e LH que promove a ovulação não é bem estabelecido, uma vez que o eixo hipotalâmico-hipofisário é hipersensível ao *feedback* negativo de estradiol que, por sua vez, limita a secreção de LH antes do início da puberdade (Day et al., 1986; Day et al., 1987). Por consequência, o folículo dominante torna-se atrésico, emergindo uma nova onda folicular (Evans et al., 1994b; Bergfeld al., 1994; Honaramooz et al., 2004).

As ondas foliculares nesta categoria são qualitativamente semelhantes àquelas já púberes, mas quantitativamente distintas (Adams et al., 1994; Ginther, et al., 1989b), sendo descritas como anovulatórias, com fases de crescimento do folículo dominante (4,7 ± 0,3 vs 6,1 ± 0,3 dias) e do primeiro folículo subordinado (2,2 ± 0,2 vs 2,4 ± 0,2 dias) reduzidas, diâmetros do maior (11,2 ± 0,2 vs 15,8 ± 0,5 mm) e segundo maior folículos (7,1 ± 0,3 vs 8,2 ± 0,4 mm) inferiores, fase estática dos folículos dominantes (5,1 ± 0,3 vs 5,8 ± 0,5) e primeiros subordinados (1,8 ± 0,2 vs 2,1 ± 0,3 dias) mais curta e menor intervalo entre as ondas (8,0 ± 0,4 vs 9,7 ± 0,2 dias) em relação a fêmeas púberes (Adams et al., 1994). Outros trabalhos, contrariamente, descrevem que as ondas foliculares em novilhas pré-púberes de seis meses de idade apresentam maior comprimento (12,73 ± 2,39 vs 9,59 ± 0,73 dias; Romano et al., 2007) e os tamanhos máximos e o tempo de vida dos folículos dominantes das ondas são semelhantes aos de bovinos adultos (Rawlings et al., 2003), sendo que tais folículos podem permanecer maiores que os demais por 2 a 10 dias (Hopper et al., 1993).

Conforme o período de peri-puberdade progride, o tempo em que o folículo dominante pode ser detectado aumenta (de 9,3 ± 0,8 a 13,1± 0,6 dias), já que o comprimento das ondas tende a aumentar em fêmeas com idades entre 2 e 34 semanas (Evans et al., 1994b). Da mesma forma, a quantidade total de folículos antrais vistos ao ultrassom (Evans et al., 1994b) e o diâmetro máximo do folículo dominante (Bergfeld et al., 1994; de Lucia et al., 2002) sofrem incremento e, consequentemente, a secreção de estradiol por tais estruturas, cujo aumento ocorre particularmente nas últimas 12 semanas antes da primeira ovulação (Evans et al., 1994a,b; Melvin et al., 1999). As concentrações deste hormônio no fluido folicular

também mostram uma tendência em aumentar com a idade (Dodson et al., 1989). Ainda, Honamorooz et al. (2004) descrevem que o padrão de alteração do diâmetro máximo do folículo ovariano ao longo do tempo também possui forte correlação com o desenvolvimento do trato reprodutivo, já que folículos maiores são mais estrogênicos e impulsionam mais intensamente o crescimento do trato reprodutivo.

Assim, o aumento da secreção de estradiol pelos folículos resulta na redução do seu *feedback* negativo sobre a secreção de GnRH e LH antes da puberdade (Honaramooz et al., 2000; Bergfeld et al., 1994) e, desta forma, o estradiol que até então inibia a secreção de LH no período pré-puberal, passa estimular a liberação deste hormônio (Romano et al., 2007). À medida que as fêmeas se aproximam da puberdade, o número e a amplitude dos pulsos de LH também aumentam (Melvin et al., 1999). Trabalhos apontam aumentos na liberação de LH entre 12 e 20 semanas de idade (Schams et al., 1981; Evans et al., 1992); por outro lado, outros estudos sugerem haver um declínio do nascimento até 15 semanas (Dodson et al.,1988), com subsequente incremento entre 36 e 52 semanas, coincidente com a puberdade (Schams et al., 1981; Day et al., 1984; Dodson et al., 1988; Evans et al., 1992).

Desta forma, sabendo-se a complexidade de fatores que determinam o padrão de ondas foliculares em novilhas pré-púberes, bem como as modificações que ocorrem neste padrão conforme o período pré-puberal progride, para que a seleção de novilhas de reposição tenha sucesso, a avaliação de aspectos relacionáveis à sua fertilidade se faz necessária. Por esta razão, o estudo de características fenotípicas que permitem caracterizar animais mais férteis em idade precoce pode permitir a otimização de manejos e contribuir para o sucesso e para a rentabilidade da bovinocultura. Dentre tais características podemos destacar a CFA, a biometria ovariana, a biometria, ecogenicidade e ecotextura uterinas e a morfometria vulvar.

2.2. Contagem de Folículos Antrais (CFA)

2.2.1. Causas das variações da CFA entre os indivíduos

Fêmeas bovinas nascem com um número altamente variável de folículos ovarianos (Burns et al., 2005) e tal variação é refletida no número de folículos antrais ao longo de toda a longevidade reprodutiva (Evans et al., 2012). Como a quantidade de folículos é determinada durante a gestação (Findlay et al., 2019), a “Hipótese de Barker” afirma que o ambiente gestacional pode influenciar no desenvolvimento do concepto (Barker, 1992) e, por isso, a nutrição e a saúde materna no momento do desenvolvimento ovariano alteram o tamanho da reserva ovariana e a subsequente fertilidade destes animais (Evans et al., 2012).

Ireland et al. (2010), por exemplo, observaram que vacas leiteiras com infecção crônica da glândula mamária e alta contagem de células somáticas durante a gestação, podem produzir filhas com função ovariana diminuída e fertilidade abaixo do ideal. Mais recentemente, foi observado que a idade da mãe também parece influenciar a população folicular de suas filhas. No estudo feito por McNeel et al. (2017) foi constatado que mães que produziram novilhas Angus com maior CFA eram 1,5 anos mais velhas do que aquelas que produziram novilhas com população folicular reduzida ($P < 0,05$).

Quanto à nutrição, Mossa et al. (2013) restringiram a oferta de alimentos de novilhas de corte cruzadas um pouco antes da concepção até o primeiro trimestre gestacional, observando CFA menor ($P < 0,05$) nas fêmeas com restrição alimentar em comparação às bezerras nascidas de mães do grupo controle. Ainda, Cushman et al. (2009) apontaram que o peso ao nascer influencia positivamente a CFA, de modo que o número total de folículos ovarianos é maior ($P = 0,007$) em bezerras que nascem mais pesadas. Eborn et al. (2013) explicam que a restrição de nutrientes afeta o tamanho da reserva ovariana através do aumento na taxa de atresia folicular ou redução na qualidade oocitária.

O grupo genético ao qual as fêmeas pertencem representa um dos fatores individuais responsáveis pela alta variabilidade da CFA entre os animais que, mesmo mantidos sob condições ambientais e nutricionais semelhantes, apresentam diferenças na atividade ovariana e hormonal (Sartori et al., 2016). Vários trabalhos apontam que fêmeas zebuínas recrutam maior número de folículos que taurinas (Alvarez et al., 2000; Carvalho et al., 2008; Sartori et al., 2016). Diferenças nas concentrações circulantes de IGF-I e a sensibilidade ao FSH embasam a principal suposição das causas de variação da CFA entre as subespécies (Alvarez et al., 2000; Sartori e Barros, 2011; Sartori et al., 2016). Os autores relatam que fêmeas *Bos indicus* apresentam concentrações circulantes de IGF-I superiores que, por sua vez, aumentam a sensibilidade de pequenos folículos às gonadotrofinas (Sartori et al., 2016) e acabam por resultar em maior recrutamento folicular neste grupo (Alvarez et al., 2000). Também justificam que zebuínas apresentam menor metabolismo hepático de esteroides e maior produção esteroidal ovariana que taurinas (Sartori et al., 2016), o que impacta diretamente na quantidade e no desenvolvimento folicular divergente entre as subespécies.

A idade também parece ser outro importante fator que influencia a CFA bovina. Alguns trabalhos relatam que vacas apresentam maior população folicular que novilhas (Cardoso et al., 2018) e que a idade da fêmea é uma variável positivamente associada à CFA (Martinez et al., 2016; Mossa et al., 2012). Martinez et al. (2016) explicam que o aumento da CFA com a idade pode ser atribuído pelo fato de que fêmeas com alto número de folículos são mais férteis e, por isso, permanecem mais tempo no rebanho. Contrariamente, Cushman et al. (2009) descreveram que a senilidade reprodutiva está ligada à redução do número de folículos presentes nos ovários a partir de cinco anos de idade, também observado por Erickson et al. (1966). Evans et al. (2012) explicam que a quantidade de folículos ovarianos reduz ao longo da vida e não é reabastecida, e que o tamanho da reserva ovariana reflete a longevidade reprodutiva da fêmea.

Estudos comprovam ainda que a CFA possui herdabilidade moderada em gado leiteiro (0,31 ± 0,14 e 0,25 ± 0,13 para vacas e novilhas, respectivamente; Walsh et al., 2014), em vacas Angus (0,48 ± 0,19; Oliveira Júnior et al., 2021) e em fêmeas Nelore (0,30 ± 0,09; Grigoletto et al., 2020), podendo ser controlada geneticamente

(Walsh et al., 2014). Outros trabalhos mostram que existe alguma influência paterna sobre o número de folículos ovarianos, mas que não há correlação entre CFA e características de mérito genético (Morotti et al., 2017a). Além disso, avaliando a herdabilidade e o impacto dos efeitos ambientais durante a gestação na CFA em fêmeas leiteiras, uma relação linear negativa foi observada entre a concentração de gordura no leite e CFA das bezerras nascidas, com redução na reserva ovariana em 0,4 a cada aumento de 1% de gordura (Walsh et al., 2014). Neste mesmo estudo, foi verificado que a produção de leite não é geneticamente correlacionada com a CFA, o que implica que a seleção para produtividade não afeta negativamente a população folicular (Walsh et al., 2014).

2.2.2. Repetibilidade da CFA

Apesar do número de folículos antrais presentes nos ovários variar entre os animais, Boni et al. (1997) observaram que o recrutamento folicular dentro dos indivíduos é altamente repetível (0,58). Batista et al. (2014) notaram valor de repetibilidade da CFA ainda maior (0,85) em novilhas das raças Nelore e Holandesa submetidas a três avaliações com intervalos de 60 dias entre elas. Mais recentemente, Morotti et al. (2017a) também confirmaram a alta repetibilidade da CFA (0,89 a 0,92) em fêmeas Braford pré-púberes avaliadas por dez meses a cada 60 dias, em dias aleatórios da dinâmica ovariana.

O termo “repetibilidade” refere-se a várias respostas tomadas em sequência num mesmo animal, com o objetivo de examinar e comparar tendências ao longo do tempo (Littell et al., 1998). Esta é expressa em um intervalo de 0 – 1 (em que 1 = perfeito; Boni et al., 1997) e é calculada pela proporção da variância total que pode ser atribuída à variância animal. A alta repetibilidade da CFA indica que o número de folículos recrutados nos ovários é estabelecido por um mecanismo compensatório crônico (Burns et al., 2005) e previamente regulado pelo indivíduo, que pode ser de grande interesse para programas de melhoramento genético animal. Ainda, permite a classificação das fêmeas em categorias de acordo com a sua população folicular

(Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007) em uma única avaliação ultrassonográfica (Singh et al., 2004).

No entanto, quanto ao efeito do momento da onda folicular sobre a CFA ainda há relatos discordantes. Burns et al. (2005) relataram que o número máximo de folículos antrais, determinado aproximadamente na emergência da onda folicular do mesmo ciclo estral ou durante ciclos estrais consecutivos, mostrou alta repetibilidade (0,95) em fêmeas Holandesas. Da mesma forma, Ireland et al. (2007) apontaram repetibilidade de 0,84 para o número máximo de folículos antrais em novilhas de corte, também entre os dias correspondentes ao final da onda folicular ovulatória e dias próximos a emergência ou dominância da primeira onda do ciclo estral subsequente.

Por outro lado, em estudo realizado com vacas Holandesas lactantes, a maior CFA foi registrada em dia aleatório do ciclo estral em relação ao dia da emergência de onda folicular e, por sua vez, a repetibilidade foi inferior (0,37) àquelas relatadas anteriormente (Gobikrushanth et al., 2017), possivelmente devido a determinação aleatória da quantidade de folículos antrais. Em outra pesquisa, fêmeas multíparas Nelore com alta (≥ 45 folículos) ou baixa (≤ 15 folículos) CFA exibiram repetibilidade elevada (0,93) entre todos os dias estudados (dia aleatório do ciclo estral, dia próximo a emergência de onda sincronizada e dia da fase luteal induzida; Morotti et al., 2018). Mais recentemente, Bonato et al. (2022), ao avaliarem a CFA diariamente durante a sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas Holandesas de alta produção leiteira, constataram valor de repetibilidade de 0,98.

Estudos apontam que a repetibilidade do número de folículos durante as ondas permanece alta em bovinos por pelo menos um ano (Burns et al., 2005), enquanto outros relatam que a quantidade de folículos pré-antrais e antrais em crescimento permanece relativamente constante até que os bovinos atinjam entre 7 e 9 anos de idade (Erickson, 1966; Katska e Smorag, 1984). Tais observações implicam que a população folicular durante as ondas pode conservar-se durante longos períodos. Confirmando isso, Silva-Santos et al. (2014) constataram alta repetibilidade (entre 0,90 e 0,92) no número de folículos antrais em fêmeas Braford com alta (≥ 40 folículos) e baixa (≤ 10 folículos) CFA durante exames ultrassonográficos do desmame a um ano de idade. Também em novilhas Braford, foi observada alta repetibilidade da CFA

das fêmeas avaliadas desde o pós-desmame até o período pré-serviço (0,72; Santa Cruz et al., 2018). Este último estudo foi conduzido por dois anos consecutivos em novilhas Hereford e Braford selecionadas no desmame e examinadas por cinco a dez dias em dois momentos distintos (pós-desmame e pré-serviço) para determinação da CFA máxima e sua repetibilidade. Somente em novilhas Braford, no segundo ano de avaliações, a repetibilidade foi considerada alta (0,72), indicando que a seleção precoce de tais novilhas ao desmame pode ser possível.

Desta forma, como a maioria dos estudos apresentam valores de repetibilidade considerados altos, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de identificar se fêmeas com maior ou menor população folicular ovariana apresentam desempenho reprodutivo e parâmetros de fertilidade relacionáveis a tal contagem. Os trabalhos têm focado em identificar se esta avaliação é preditiva do potencial reprodutivo das fêmeas, embora os resultados ainda permaneçam controversos. Também há indicação de que o momento da onda folicular (emergência e dominância) e a raça podem interferir na repetibilidade da CFA; respostas para tais indagações ainda não foram encontradas.

2.2.3. Padrões hormonais e a CFA

A variação da CFA bovina reflete em diferentes padrões hormonais que acabam por influenciar diretamente a sua função reprodutiva. Fêmeas taurinas com baixa CFA apresentam concentrações circulantes de progesterona cronicamente baixas (Jimenez-Krassel et al., 2009), sendo mais propensas à ocorrência de mortalidade embrionária (Diskin e Morris, 2008). Contrariamente, Lima et al. (2020) constataram uma tendência (P = 0,06) em vacas Nelore com baixa CFA (≤ 15 folículos) a apresentarem maiores concentrações séricas de progesterona que aquelas com alta CFA (≥ 45 folículos). Da mesma forma, Bonato et al. (2022) encontraram maiores (P = 0,02) concentrações de progesterona em vacas Holandesas lactantes com baixa CFA (≤ 15 folículos) em relação àquelas com alta CFA (≥ 25 folículos).

Quanto às gonadotrofinas a relação é inversa, sendo que bovinos com CFA reduzida apresentam altas concentrações de tais hormônios (Burns et al., 2005;

Ireland et al., 2007; Jimenez- Krassel et al., 2009). Tal cenário altera a função ovariana e resulta em baixa responsividade à superovulação e menor produção embrionária para transferência em fêmeas com reserva folicular ovariana inferior (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007). No entanto, alguns autores declaram que a capacidade inerente da pituitária de produzir gonadotrofinas não difere entre bovinos com alta ou baixa reserva ovariana (Mossa et al., 2010). Por esta razão, fatores vinculados aos ovários são as causas mais plausíveis para as variações nas concentrações circulantes de FSH e LH em animais com CFA diferentes, podendo estar associadas à responsividade e à sensibilidade ovariana diante de tais hormônios (Mossa et al., 2010).

Ainda, Mossa et al. (2010) constataram que a produção ovariana de andrógenos está positivamente associada ao número de folículos antrais, mas as possíveis causas desta variação são desconhecidas. Os andrógenos fornecem substrato para a produção de estradiol (King et al., 2007; Walters et al., 2008) que, por sua vez, também apresenta concentrações superiores em fêmeas com alta CFA, conforme descrito por Sakaguchi et al. (2019). Neste mesmo estudo, a CFA e a dosagem hormonal de vacas Holandesas foram comparadas entre si e mostraram que as concentrações de estradiol e testosterona são maiores ($P < 0,05$) no grupo de CFA superior (> 30 folículos). Os autores acreditam que fêmeas com alta CFA e concentração de estradiol circulante superior são mais capazes de suprimir a secreção de FSH que, por esta razão, aparece com dosagens plasmáticas inferiores neste grupo (Sakaguchi et al., 2019).

A dosagem da concentração plasmática de AMH também mostrou ser um método confiável para predizer a reserva ovariana em fêmeas bovinas (Ireland et al., 2008; Cardoso et al., 2018). Tal hormônio é altamente correlacionado à quantidade de folículos presente nos ovários, sendo considerado um marcador endócrino da população folicular (Baruselli et al., 2015; Cardoso et al., 2018). Foi observada correlação significativa ($r = 0,92$; $P < 0,01$) entre a concentração de AMH e a CFA ovariana média diária ao longo dos ciclos estrais em fêmeas taurinas, sendo que aquelas classificadas com alta CFA (≥ 25 folículos) apresentaram maior concentração de AMH (Ireland et al., 2008). O mesmo padrão foi confirmado em fêmeas zebuínas (Batista et al., 2014) e cruzadas (Cardoso et al., 2018). As pesquisas explicam que

bovinos com alta CFA apresentam maior expressão de mRNA de AMHR2α (receptor de AMH; Rosa et al., 2018) e, por esta razão, tal hormônio pode afetar o padrão de desenvolvimento folicular, tanto através da modulação da resposta ovariana ao FSH e LH (Sacchi et al., 2016), como também a esteroidogênese (Batista et al., 2020).

2.2.4. CFA e fertilidade

A hipótese de que a população folicular ovariana impacta a fertilidade da fêmea é um princípio antigo da biologia da reprodução (Erickson, 1966) que ainda é foco de inúmeras pesquisas (Morotti et al., 2017b). O número de folículos antrais está positivamente associado a múltiplas medidas de fertilidade em bovinos (Erickson et al., 1976; Ireland et al., 2008) e, por esta razão, a CFA pode ser uma ferramenta útil para incrementar o desempenho reprodutivo das fêmeas. Bovinos com diferentes CFA apresentam características reprodutivas diferentes (Martinez et al., 2016), desde resposta ovariana a tratamentos superovulatórios (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007), concentrações hormonais (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; 2009; Mossa et al., 2010; Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2012; Batista et al., 2014; Cardoso et al., 2018; Sakaguchi et al., 2019), taxa de prenhez e intervalo entre partos (Mossa et al., 2012), até produção de oócitos e embriões (Ireland et al., 2008).

A correlação positiva entre CFA e fertilidade foi principalmente descrita em fêmeas taurinas. Neste grupo genético, estudos apontam melhor performance reprodutiva em bovinos com maior CFA, independente da biotecnologia utilizada (Morotti et al., 2017b). Ireland et al. (2008) relataram que a CFA está altamente correlacionada com o número total de oócitos morfologicamente saudáveis nos ovários de fêmeas taurinas cruzadas, o que permite estimar a longevidade reprodutiva do animal. Ainda, para comprovar a hipótese de que a CFA e a fertilidade caminham juntas em animais taurinos, Mossa et al. (2012) constataram que vacas Holandesas com maior CFA (≥ 25 folículos) exibem maiores taxas de prenhez (94 vs 84%) quando submetidas à inseminação artificial (IA), menor intervalo entre parto e concepção (100 vs 114 dias) e recebem menos serviços (2,7 vs 2,3) durante a estação reprodutiva quando comparadas àquelas com baixa CFA (≤ 15 folículos).

Martinez et al. (2016) também provaram que vacas taurinas com CFA elevada (≥ 30 folículos) apresentam menor intervalo do parto à concepção por IA (82,4 ± 1,6 vs 87,3 ± 1,2 dias) e maior probabilidade de manifestar altas taxas de prenhez na primeira IA (68,1 vs 45,3%) do que fêmeas com CFA inferior (≤ 20 folículos). Mais recentemente, vacas Angus com alta CFA (≥ 25 folículos) também exibiram maior taxa de prenhez à IATF em relação àquelas com CFA inferior (59,7 vs 39,8%; Oliveira Júnior et al., 2021). Curiosamente, Jimenez-Krassel et al. (2017) revelaram fertilidade abaixo do ideal e uma vida produtiva mais curta para fêmeas Holandesas com alta CFA (≥ 25 folículos). Tal trabalho relatou que a alta CFA (≥ 25 folículos) está positivamente ligada a uma taxa de sobrevivência reduzida (P = 0,05), menos lactações (P < 0,02) e vida reprodutiva 180 dias mais curta em comparação com novilhas de baixa CFA (≤ 15 folículos; P < 0,01). Esses achados contrariam um estudo mais antigo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, em que foi comprovada a associação positiva entre as dosagens de AMH e a longevidade reprodutiva de novilhas Holandesas (Jimenez-Krassel et al., 2015).

Cunha et al. (2020) relataram que as taxas de prenhez não diferem entre fêmeas taurinas com alta ou baixa CFA (> 17 ou < 12 folículos, respectivamente) submetidas à IATF (P > 0,11). Mais recentemente, Bonato et al. (2022) apontaram que vacas Holandesas com baixa CFA (≤ 15 folículos) possuem maior diâmetro (P = 0,05) e área de fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório (P = 0,005), maior área (P = 0,0001) e perfusão luteal (P = 0,02) do que vacas com alta CFA (≥ 25 folículos). Os resultados controversos sobre a utilidade da contagem folicular ovariana para predizer a fertilidade em fêmeas *Bos taurus* indicam que esta pode não ser a melhor ferramenta para seleção e, por isso, acredita-se que extremos da quantidade de folículos antrais podem estar associados à redução da fertilidade em bovinos (Cunha et al., 2020). A inconstância de resultados relacionados à CFA indica que é importante priorizar o mérito genético ao selecionar uma fêmea para reprodução, conforme revisado por Morotti et al. (2015).

A CFA também parece influenciar o período de parto na espécie bovina. McNeel e Cushman (2015) constataram que para cada dia adicional à data do parto, houve uma redução de 0,12 no número de folículos detectados por ultrassonografia no exame anterior à parição; isto significa que fêmeas que parem no início da estação

reprodutiva possuem maior reserva ovariana do que aquelas que parem tardiamente (McNeel e Cushman, 2015). Maculan et al. (2018) também comprovaram que, em vacas Tabapuã, maior CFA (> 50 folículos) está correlacionada a intervalo entre partos mais curto ($r = -0,28$; $P < 0,005$). Ainda, em outro trabalho mais recente, foi observado que novilhas Hereford, Angus e cruzadas Angus-Hereford com CFA alta (> 17 folículos) conceberam cerca de uma semana antes de novilhas com CFA baixa (< 13 folículos; Cunha et al., 2020). Os achados apontam que a seleção de novilhas de reposição com base na população folicular ovariana pode permitir a identificação daquelas que conceberão precocemente durante a estação reprodutiva (Cunha et al., 2020).

A CFA pode afetar também a produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*, tanto quanto à quantidade de embriões produzidos pela doadora, como também na eficiência do processo e resposta aos protocolos superovulatórios, com taxas mais elevadas para animais com CFA alta (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007; 2008). Foi comprovado que bovinos de corte com CFA superior (≥ 25 folículos) exibem maior número de embriões recuperados na múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE; Ireland et al., 2007), sendo $10,6 \pm 2,7$ vs $4,7 \pm 0,7$ para o grupo de alta e baixa CFA, respectivamente ($P < 0,05$). Ainda, fêmeas mestiças (Silva-Santos et al., 2014), taurinas (Ireland et al., 2008) e zebuínas (Santos et al., 2016) com CFA superior, apresentam maior quantidade de oócitos viáveis quando comparadas àquelas de população folicular inferior.

A relação da qualidade oocitária e CFA também tem sido objeto de inúmeros estudos, sendo que um deles mostra que oócitos provenientes de vacas com alta CFA (≥ 30 folículos) apresentam maior competência para fertilização *in vitro* quando a aspiração folicular é feita em intervalo curto (3 – 4 dias; Nagai et al., 2015). Em outra pesquisa também foi verificado que vacas Holandesas com CFA alta (≥ 25 folículos) possuem oócitos com atividade mitocondrial, taxa de clivagem e competência de maturação nuclear superiores (Nagai et al., 2016). Ireland et al. (2009) identificaram que fêmeas com CFA inferior (≤ 15 folículos) apresentam maiores concentrações intrafoliculares de estradiol, o que prejudica a maturação e a competência oocitária destas (Beker-van Woudenberg et al., 2004).

Embora fêmeas *Bos indicus* tenham mostrado que a grande quantidade de folículos antrais está positivamente associada à produção de embriões, a relação positiva entre CFA e taxa de concepção em vacas Nelore submetidas à IATF não foi observada por Santos et al. (2016). Morotti et al. (2018), Moraes et al. (2019) e Lima et al. (2020), por outro lado, mostraram que vacas Nelore com CFA baixa apresentam taxas de prenhez e de concepção maiores em comparação às fêmeas com alta CFA. Também relataram que o diâmetro folicular é maior em vacas com CFA inferior ($P < 0,05$) a partir do quarto dia de tratamento hormonal, assim como do folículo pré-ovulatório (Morotti et al., 2018). Lima et al. (2020), seguindo a mesma linha de pesquisa, confirmaram que vacas multíparas Nelore com CFA muito baixa (≤ 15 folículos) apresentam maior folículo dominante ($P < 0,01$), tendência à maior folículo pré-ovulatório ($P = 0,06$) e maior concentração sérica de progesterona ($P = 0,06$) em relação às fêmeas com maior CFA, aspectos esses que contribuem para as melhores taxas de concepção nas primeiras (Morotti et al., 2018). Oócitos e células *cumulus* de bovinos com CFA muito baixa apresentaram maior expressão de genes ligados à comunicação intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, resposta ao estresse celular e crescimento folicular, que favorecem o maior diâmetro do folículo dominante e oócitos mais competentes (Lima et al., 2020).

Estudos apontam ainda que a CFA pode estar associada a parâmetros de desenvolvimento e crescimento de manifestação precoce da puberdade em novilhas mestiças e taurinas (Morotti et al., 2017a; Santa Cruz et al., 2018). Neste último estudo foi observada uma associação entre CFA e composição corporal, sendo que fêmeas com CFA diminuída apresentaram redução de peso corporal, altura do quadril e área de olho de lombo (Santa Cruz et al., 2018). Tais resultados indicam que estas crescem mais lentamente e, por isso, alcançam a puberdade mais tardiamente (Patterson et al., 1992). No entanto, trabalhos anteriores em bovinos não identificaram uma relação positiva entre CFA e puberdade (Cushman et al., 2014), assim como Cunha et al. (2020), que notaram que embora novilhas taurinas com alta CFA sejam mais pesadas, altas e possuam maior escore de condição corporal, a CFA está negativamente associada ao desenvolvimento de seu trato reprodutivo. Portanto, a relação entre puberdade e CFA em novilhas requer maiores investigações.

A divergência entre o efeito da CFA sob o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas taurinas e zebuínas deve-se às diferenças fisiológicas na dinâmica folicular entre as subespécies (Morotti et al., 2018) o que, por consequência, ocasiona discrepâncias entre seus padrões reprodutivos. Segundo Morotti et al. (2017b), a grande variabilidade da CFA entre os estudos, a ausência de padronização nas classificações das fêmeas segundo a contagem folicular ovariana, as diferenças entre rebanhos, categorias, manejos e delineamento experimental dificultam o entendimento do efeito da população folicular sobre a fertilidade bovina. Os autores afirmam ainda que a biotécnica reprodutiva utilizada é outro grande desafio em relação à CFA (Morotti et al., 2017b), conforme revisado anteriormente. Tal cenário reforça a necessidade de novas pesquisas a respeito das possíveis causas de variação e as diferenças da CFA entre os subgrupos raciais, sua repetibilidade dentro dos animais e, em especial, sua relação com preditores diretos e indiretos de fertilidade nas diferentes biotecnologias reprodutivas existentes.

2.3. Outros potenciais preditores de fertilidade

2.3.1. Biometria ovariana

Inúmeros estudos relatam que a biometria ovariana está associada à sua funcionalidade e população folicular (Cushman et al., 2009; Mossa et al., 2012; Eborn et al., 2013; Modina et al., 2014; Martinez et al., 2016; Morotti et al., 2018; Lima et al., 2020). Foi observada correlação positiva significativa entre peso, diâmetro e altura ovariana com a população folicular em vacas leiteiras ($r = 0,86$; $P < 0,01$; Modina et al., 2014) e novilhas de corte ($r = 0,51$ e $0,40$; $P \leq 0,01$; Eborn et al., 2013). Em vacas taurinas cruzadas e Holandesas foi relatada maior altura, comprimento (Ireland et al., 2008) e área ovariana (Mossa et al., 2012) naquelas com alta CFA (≥ 25 folículos). O mesmo foi observado em vacas e novilhas de corte, em que o comprimento do ovário foi superior naquelas com CFA elevada (> 24 folículos; Cushman et al., 2009). Este estudo justifica que é necessário maior massa cortical ovariana para suportar o crescimento de grande quantidade de folículos (Cushman et al., 2009) o que,

consequentemente, reflete em biometria ovariana superior. Mais recentemente, Morotti et al. (2018) e Lima et al. (2020) também observaram diâmetro, perímetro e área ovariana superiores em fêmeas Nelore com alta CFA (≥ 45 folículos; P ≤ 0,0001). Este último trabalho aponta que vacas com alta CFA possuem quase duas vezes o número de folículos por área ovariana em comparação àquelas com CFA muito baixa (7,0 ± 0,3 vs 3,8 ± 0,4 folículos/mm^2, respectivamente; Lima et al., 2020).

Contrariando tal cenário, a relação entre as dimensões ovarianas e CFA não foi observada em fêmeas Tabapuã, indicando que as diferenças fisiológicas entre os grupos raciais podem refletir na anatomia destes (Maculan et al., 2018). Em outro trabalho foi comprovado que ovários de tamanhos médios (> 7 e ≤ 11 mm^3) são mais funcionais que os extremos (Mesquita et al., 2016). Ainda, Modina et al. (2014) relataram que ovários de fêmeas com baixa CFA apresentam características semelhante àqueles com falência ovariana prematura (ovários pequenos e duros à palpação transretal, com desenvolvimento folicular limitado ou ausente; Opsomer et al.,1998), o que pode indicar senescência ovariana precoce.

Tal correlação é um importante achado prático, visto que a determinação do tamanho ovariano exige menos tempo e habilidade ao operador do aparelho ultrassonográfico (Mossa et al., 2012). Cushman et al. (2009) também assumiram que as dimensões ovarianas são influenciadas pelo peso ao nascer e que o peso total ovariano, excluindo-se o corpo lúteo, não difere ao longo das diferentes fases do ciclo estral e do desenvolvimento folicular, o que indica que tal medida possui alta repetibilidade, assim como a CFA, e pode ser aferida em qualquer fase do ciclo para predizer o desempenho reprodutivo da fêmea. A diferença de área ovariana pode se dar também pela categoria da fêmea. Estudo feito com novilhas Nelore detectou maior área ovariana naquelas já púberes (4,15 ± 0,01 cm^2) em comparação àquelas que ainda não atingiram a puberdade (3,15 ± 0,01 cm^2; P < 0,01; Monteiro et al., 2013).

2.3.2. Biometria, ecogenicidade e ecotextura uterina

A possibilidade de avaliar mudanças morfológicas uterinas por meio de uma técnica não invasiva e rápida tornou-se possível desde que a ultrassonografia Modo-B passou a ser difundida (Pierson e Ginther, 1984). A avaliação da biometria uterina, por exemplo, está relacionada às taxas de fertilidade da fêmea e funciona como indicador precoce da ovulação (Souza et al., 2011). Por meio desta análise, foi observado que a espessura do endométrio varia devido a alterações hormonais que atuam através da sinalização entre ovários e útero (Baerwald e Pierson, 2004). Em novilhas Nelore foi descrita correlação positiva entre a espessura endometrial e área ovariana ($r = 0,58$; $P < 0,01$), confirmando que a atividade ovariana influencia diretamente no desenvolvimento endometrial através da secreção de hormônios (Monteiro et al., 2013). Em vacas Holandesas foi relatada correlação positiva ($r = 0,33$; $P = 0,02$) entre as concentrações circulantes de estradiol e a espessura endometrial (Souza et al., 2011), indicando que, durante a fase folicular do ciclo estral, o estradiol produzido pelos folículos ovarianos estimula o crescimento endometrial (Garverick et al., 1971; Johnson et al., 1997; McNeel et al., 2017).

Bonafos et al. (1995) constataram que o tônus e a contratilidade do útero aumentam no período periovulatório e que o útero túrgido, contrátil e edemaciado no estro facilita o transporte e armazenamento espermático (Vandemark e Moeller, 1951). Após a manifestação do estro, o peso uterino reduz (Jimenez-Krassel et al., 2009) e, em seguida à ovulação, com o estabelecimento do corpo lúteo e sua produção de progesterona, o endométrio é preparado, através de suas glândulas, para fornecer um ambiente propício à possível implantação embrionária (Baulieu et al., 1980; Chikazawa et al., 1986; Guidice e Ferenczy, 1996). Ainda, Souza et al. (2011) constataram que existe uma correlação negativa entre a espessura endometrial e as concentrações circulantes de progesterona ($r = - 0,28$; $P = 0,05$), o que confirma a redução das dimensões uterinas no momento em que as concentrações deste hormônio é alta.

Ao compararem a variação da CFA com dosagens plasmáticas de progesterona e espessura uterina em fêmeas bovinas, Jimenez-Krassel et al. (2009)

confirmaram que as diferenças observadas nas concentrações circulantes de progesterona entre os animais com alta ou baixa CFA afetam também as flutuações do tamanho endometrial durante os ciclos reprodutivos (Bonafos et al., 1995; Johnson et al., 1997; Baerwald e Pierson, 2004). Bovinos com baixa CFA apresentam endométrio com espessura reduzida, bem como menor concentração circulante de progesterona durante do diestro (Jimenez-Krassel et al., 2009). Concentrações circulantes reduzidas de tal hormônio podem refletir negativamente no crescimento e função endometrial, resultando em altas taxas de mortalidade embrionária (Diskin e Morris, 2008). Outros estudos também mostram que novilhas com CFA maior, além de possuírem tamanho e peso uterino superiores, produzem e secretam maior conteúdo de proteína uterina, proporcionando ambiente ainda mais apropriado para o desenvolvimento embrionário (McNeel et al., 2017).

Diante deste cenário, a avaliação da biometria uterina pode ser um bom indicador do ambiente hormonal (seja concentração baixa de progesterona e/ou alta de estradiol), podendo nortear a identificação da fertilidade ideal (Souza et al., 2011). Além desta avaliação, com a evolução dos softwares de análise de textura e ecoestrutura de órgãos, a determinação quantitativa e objetiva dos pixels de imagens ultrassonográficas uterinas tornou-se possível (Schamuder et al., 2008) e, consequentemente, com ela veio a caracterização da microestrutura e composição química do tecido avaliado (Chandolia et al., 1997). Esta análise, por sua vez, permite a identificação de alterações uterinas, de modo a diagnosticar com mais rapidez e precisão o manejo da fertilidade bovina (Schmauder et al., 2008) e até mesmo detectar a gestação mais precocemente (Scully et al., 2015). Atualmente, a ecogenicidade e a ecotextura da parede uterina podem ser analisadas com auxílio de softwares específicos com valores numéricos de pixel em escala de cinza de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto), fornecendo resultados estatísticos de acordo com a densidade relativa ou a capacidade dos tecidos de refletir e transmitir um feixe de ultrassom (Pierson e Adams, 1995; Chandolia et al., 1997).

Com o objetivo de examinarem as mudanças na ecotextura e homogeneidade endometrial ao longo de dois ciclos estrais subsequentes de vacas uníparas Simental, Schmauder et al. (2008) constataram que o dia do ciclo estral ($P < 0,0001$) e o indivíduo analisado ($P < 0,05$) exercem um efeito significativo nos resultados destas

análises. Este estudo indicou que há uma relação inversa entre as mudanças na ecogenicidade e homogeneidade uterinas ao longo do ciclo estral decorrentes de alterações no grau de edema do órgão, que estão relacionadas às respectivas mudanças nas concentrações plasmáticas de estrógenos durante o ciclo (Schmauder et al., 2008). Durante a fase mais estrogênica é depositado fluido nos espaços teciduais do endométrio que, por ser hipoecoico em relação a outros tecidos, diminui a ecogenicidade geral uterina (Schmauder et al., 2008). A redução do edema no diestro, por sua vez, é acompanhada pelo aumento da ecogenicidade e, concomitantemente, redução da homogeneidade do endométrio (Ginther, 1998).

A biometria, ecogenicidade e ecotextura uterina parecem variar também com a idade da fêmea. Honaramooz et al. (2004) descreveram que os pesos uterinos de novilhas Hereford aumentaram linearmente do nascimento até a primeira ovulação, e a heterogeneidade de pixels uterina, por sua vez, evoluiu ao final do crescimento pós-natal. Ainda, Dhaliwal et al. (2002) apontaram útero com altura e volume inferiores em novilhas em relação a vacas (Dhaliwal et al., 2002). Outro estudo mais recente constatou que a espessura endometrial é maior nas novilhas que já atingiram a puberdade (12,15 ± 0,08 mm) do que aquelas que ainda são pré-púberes (9,93 ± 0,04 mm; $P < 0,05$), o que confirmou o papel da biometria uterina como indicador do início da manifestação do estro e ovulação (Monteiro et al., 2013).

2.3.3. Morfometria da genitália externa

A vulva é a porção final do trato genital tubular formada pelos lábios vulvares, que se unem conjuntamente nos ângulos dorsal e ventral (Konig e Liebich, 2016). A rima vulvar é a sua abertura externa em forma de fenda vertical. Seu tamanho consiste no comprimento entre as comissuras dorsais e ventrais da fenda. Já a largura da vulva pode ser determinada pela distância entre as suas bordas laterais a partir do ponto médio da rima, em um ângulo de 90° (Mesquita et al., 2016). Assim, a morfometria da genitália externa da fêmea é uma medida de fácil uso e visibilidade, que pode ser empregada como ferramenta complementar para predizer a eficiência reprodutiva,

uma vez que o tamanho das estruturas reprodutivas está relacionado a características de fertilidade do rebanho (Maculan et al., 2018).

Diante deste cenário, estudos recentes foram delineados para identificar possíveis relações entre o tamanho da genitália externa e o desempenho reprodutivo bovino. Mesquita et al. (2016) constataram que fêmeas Tabapuã com maior CFA apresentam maior comprimento de rima e largura vulvar relativos ($P < 0,05$). Esta última medida esteve mais fortemente associada à população folicular e foi considerada como o melhor preditor avaliado no trabalho citado, embora os limites externos vulvares sejam difíceis de identificar em algumas fêmeas e podem reduzir a uniformidade do método (Mesquita et al., 2016). Também em fêmeas Tabapuã, outro trabalho identificou que aquelas com alta CFA (> 50 folículos) possuem maior largura vulvar e, por sua vez, exibem maior eficiência reprodutiva e menor intervalo entre partos em comparação às fêmeas com CFA inferior ($P < 0,05$; Maculan et al., 2018). Mais recentemente, Vasconcelos et al. (2020), ao compararem a largura vulvar com a viabilidade oocitária, eficiência da produção de embriões *in vitro* e taxa de prenhez de vacas Brahman e Simental observaram que, dependendo da raça, tal medida pode afetar cada parâmetro de forma diferente. Os resultados deste último estudo indicam que em vacas da raça Simental, a largura intermediária da vulva deve ser escolhida em relação aos outros extremos de classificação (Vasconcelos et al., 2020).

As dimensões da genitália externa podem ser influenciadas pelo estado fisiológico, reprodutivo e pela genética das fêmeas (Maculan, 2018). A rima é menor ($P < 0,001$) em nulíparas em comparação a vacas primíparas e multíparas, porém a ordem de partos não influencia na largura vulvar ($P = 0,08$; Maculan et al., 2018). Além disso, edema vulvar pode ser observado no período pré e pós-parto (Cheong e Gilbert, 2014), bem como durante a manifestação do estro (Layek et al.; 2011) devido ao aumento nas concentrações circulantes de estradiol (Cheong e Gilbert, 2014). Ainda, Maculan (2018) constataram que fêmeas *Bos indicus* possuem maior largura vulvar que *Bos taurus* ($P = 0,0007$). Também é importante salientar que o tamanho das estruturas anatômicas pode estar relacionado ao tamanho do animal e, por esta razão, medidas corporais devem ser consideradas para a mensuração segura de tais órgãos (Maculan et al., 2018).

3. REFERÊNCIAS

Adams GP, Singh J (2015) Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In.: Hopper RM (Ed). **Bovine Reproduction**. John Wiley & Sons, Inc., p. 219-244.

Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC (1994) Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 100:27-33.

Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC (1994) Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 100:27-33.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP (1992) Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 94:177-188.

Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC Jr, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wettemann RP (2000) Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science** 78:1291-1302.

Baerwald AR, Pierson RA (2004) Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 24:453-60.

Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS (1997) Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction** 56:1158-1168.

Barker DJ (1992) The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. **Proceedings of the Nutrition Society** 51:135-144.

Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH (2015) Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science** 12:487-497.

Baruselli PS, Giemens LU, Sales JNS (2007) Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31:205-211.

Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Renno FP, Baruselli PS (2014) Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction Domestic Animal** 49:448-452.

Batista EOS, Vieira LM, Freitas BG, Guerreiro BM, Carvalho JGS, Mingoti RD, Vasconcellos G, Souza AH, Ferraz JBS, Baruselli OS (2020) Anti-Mullerian hormone and its relationship to ovulation response and fertility in timed AI *Bos indicus* heifers. **Reproduction in Domestic Animals** 55:753-758.

Baulieu E, Mortel R, Robel P (1980) Estrogen and progesterone receptors in normal and pathological human endometrium. In.: Kimball FA (Ed.) **The Endometrium**. New York: SP Medical and Scientific Books, p. 85-105.

Beker-van Woudenberg AR, van Tol HTA, Roelen BAJ, Colenbrander B, Bevers MM. (2004) Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. **Biology of Reproduction** 70:1465-1474.

Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Garcia-Winder M, Kinder JE (1994) Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of Reproduction** 51:1051-1057.

Bonafos LD, Kot K, Ginther OJ (1995) Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous-cycle and early-preganncy. **Theriogenology** 43:713-21.

Bonato DV, Ferreira EB, Gomes DN, Bonato FGC, Droher RG, Morotti F, Seneda MM (2022) Follicular dynamics, luteal characteristics, and progesterone concentrations in synchronized lactating Holstein cows with high and low antral follicle counts. **Theriogenology** 179:223-229.

Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J, Kruip TAM (1997) Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology** 48:277-289.

Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ (2005) Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction** 73:54-62.

Cardoso CJT, Oliveira Junior JS, Kischel H, Silva WAL, Arruda EDS, Souza-Cáceres MB, Oliveira FAM, Nogueira E, Nogueira GP, Melo-Sterza FA (2018) Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicule population in heifers. **Animal Reproduction** 15:12-16.

Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS (2008) Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology** 69:167-175.

Chandolia RK, Bartlewski PM, Omeke BC, Beard AP, Rawlings NC, Pierson RA (1997) Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. **Theriogenology** 48:99-117.

Cheong SH, Gilbert RO (2014) Massive vulvar edema in 2 prepartum dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal** 55:462-465.

Chikazawa K, Araki S, Tamada T (1986) Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 62: 305-313.

Cunha F, Cushman RA, Cruz RS, Nava G, Viñoles C (2020) Antral follicular count has limited impact in the selection of more fertile beef heifers. **Livestock Science** 241:104230.

Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC (2009) Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science** 87:1971-1980.

Cushman RA, McNeel AK, Freetly HC (2014) The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. **Livestook Science** 162:252-8.

Day ML, Anderson LH (1998) Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science** 76:1-15.

Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, Zalesky DD, Schanbacher CD, Kittok RJ, Kinder JE (1984) Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction** 31:332-341.

Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE (1987) Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction** 37:1054-1065.

Day ML, Imakawa K, Zalesky DD, Kittok RJ, Kinder JE (1986) Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone- releasing hormone in heifers. **Journal of Animal Science** 62:1641-1648.

De Lucia RFS, Pereira FV, Nogueira, GP (2002) Follicular population in precocious and non precociousNelore heifers during prepubertal period. **Theriogenology** 57 (Suppl. 1):603.

Dhaliwal GS, Murray RD, Rees EM, Howard CV, Beech DJ (2002) Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. **Research in Veterinary Science** 73:259-65.

Diskin MG, Morris DG (2008) Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals** 43:260-267.

Dodson SE, Macleod BJ, Haresign W, Peters AR, Lamming GE, Das D (1989) Ovarian control of gonadotrophin secretion in the prepubertal heifer. **Animal Reproduction Science** 21:1-10.

Dodson SE, Mc Leod BJ, Haresign W, Peters AR, Lamming GE (1988) Endocrine changes from birth to puberty in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility** 82:527-538.

Duittoz AH, Tillet Y, Le Bourhis D, Schibler L (2016) The timing of puberty (oocyte quality and management). **Animal Reproduction** 13:313-333.

Eborn DR, Cushman RA, Echternkamp SE (2013) Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. **Journal of Animal Science** 91:4168-4179.

Erickson BH (1966) Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science** 25:800-805.

Erickson BH, Reynolds RA, Murphree RL (1976) Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cows. **Biology of Reprouction** 15:555-560.

Evans AC, Currie WD, Rawlings NC (1992) Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 96:847-55.

Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC (1994a) Endocrine and ovarian follicular changes leading up to first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 100:187-194.

Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC (1994b) Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility** 102:463-470.

Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Ireland JJ (2012) Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reproduction in Domestic Animals** 47:31-37.

Figueiredo R, Barros C, Pinheiro O, Soler J (1997) Ovarian folicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology** 47:1489-505.

Findlay JK, Dunning KR, Gilchrist RB, Hutt KJ, Russell DL, Walters KA (2019) **Follicle Selection in Mammalian Ovaries**. Academic Press, p. 33-21.

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science** 82-83:109-126.

Garverick HA, Erb RE, Niswender GD, Callahan CJ (1971) Reproductive steroids in bovine .3. Changes during estrous cycle. **Journal of Animal Science** 32:946-56.

Ginther OJ (1998) Tubular genitalia. In: Ginther OJ (Ed.). **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction**. Wisconsin: Equiservices Publishing, Cross Plains, p. 105-128.

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L (1989a) Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology** 32:787-795.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989b) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility** 87:223-230.

Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinjé TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ (2017) Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. **Theriogenology** 92:90-94.

Grigoletto L, Santana MHA, Bressan FF, Eler JP, Nogueira MFG, Kadarmideen HN, Baruselli PS, Ferraz JBS, Brito LF (2020) Genetic parameters and genome-wide association studies for anti-müllerian hormone levels and antral follicle populations measured after estrus synchronization in Nellore cattle. **Animals** 10:1185.

Guidice L, Ferenczy A (1996) The endometrial cycle. In.: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (Eds). **Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology**. Philadelphia: Lipincott–Raven Publishers, p. 271-300.

Honaramooz A, Aravindakshan J, Chandolia RK, Beard AP, Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC (2004) Ultrassonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal Reproduction Science** 80:15-29.

Honaramooz A, Chandolia RK, Beard AP, Rawlings NC (2000) Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** 199:207-215.

Hopper HW, Silcox RW, Byerley DJ, Kiser TE (1993) Follicular development in prepubertal heifers. **Animal Reproduction Science** 31:7-12.

Ireland JJ, Scheetz D, Jimenez F, Folger JK, Smith GW, Mossa F, Evans ACO (2010) Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters. **In '43rd Annual Meeting for the Society for Study of Reproduction'**.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO (2007) 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** 22:1687-1695.

Ireland JJ, Zielak-Steciwko AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettegowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO (2009) Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction** 80:954-964.

Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ (2008) Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction** 79:1219-1225.

Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ (2009) Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction** 80:1272-1281.

Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Ireland JLH, Pursley JR, Smith GW, Tempelman RJ, Ferris T, Roudebush WE, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ (2015) Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science** 98:3036-3045.

Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Pursley JR, Ireland JJ (2017) 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** 100:5019-5027.

Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP (1997) Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. **Biology of Reproduction** 57:588-96.

Katska L, Smorag Z (1984) Number and quality of oocytes in relation to age in cattle. **Animal Reproduction Science** 7:451-460.

King AJ, Bari Olivier N, Mohankumar PS, Lee JS, Padmanabhan V, Fink GD (2007) Hypertension caused by prenatal testosterone excess in female sheep. American Journal of Physiology. **Endocrinology and Metabolism** 292:1837–1841.

Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ (1989) Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology** 6:111-120.

Konig HE, Liebich HG (2016) **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. Porto Alegre: Grupo A Educação, p. 824.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Behera K, Chand S (2011) Behavioural signs of estrus and their relationship to time of ovulation in Zebu (Sahiwal) cattle. **Animal Reproduction Science** 129:140-145.

Lima MA, Morotti F, Bayeux BM, Rezende RG, Botigelli RC, De Bem THC, Fontes PK, Nogueira MFG, Meirelles FV, Baruselli PS, Silveira JC, Perecin F, Seneda MM (2020) Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in Bos indicus females with a high or low antral follicle count. **Nature: Scientific Reports** 10:19557.

Littell RC, Henry PR, Ammerman CB (1998) Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. **Journal of Animal Science** 76:1216-1231.

Maculan R (2018). **Utilização de características indicadoras de fertilidade na predição do potencial reprodutivo de fêmeas e machos *Bos taurus* e *Bos indicus*.** 98 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – UFLA, Lavras.

Maculan R, Pinto TLC, Moreira GM, Vasconcelos GL, Sanches JA, Rosa RG, Bonfim RR, Gonçalves TM, Souza JC (2018) Anti-mullerian hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal Reproduction Science** 189:84-92.

Martinez MF, Sanderson N, Quirke LD, Lawrence SB, Juengel JL (2016) Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology** 85:466-475.

McNeel AK, Cushman RA (2015) Influence of puberty and antral follicle count on calving day in crossbred beef heifers. **Theriogenology** 84:1061-1066.

McNeel AK, Soares EM, Patterson AL, Vallet JL, Wright EC, Erin LL, Amundson OL, Miles JR, Chase Jr CC, Lents CA, Wood JR, Cupp AS, Perry GA, Cushman, RA (2017) Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. **Animal Reproduction Science** 179:1-9.

Melvin EJ, Lidsey BR, Quintal Franco J, Zanella E, Fike KE, Van Tassel CP, Kinder JE (1999) Circulating concentrations of estradiol, LH and FSH during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. **Biology of Reproduction** 60:405-412.

Mesquita NF, Maculan R, Maciel LFS, Alves N, De Carvalho RR, Moreira GM, De Souza JC (2016) Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **Journal of Reproduction and Development** 62: 587-590.

Modina SC, Tessaro I, Lodde V, Franciosi F, Corbani D, Luciano AM (2014) Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development** 26:235-244.

Monteiro FM, Mercadante MEZ, Barros CM, Satrapa RA, Silva JAV, Oliveira LZ, Saraiva NZ, Oliveira CS, Garcia JM (2013) Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. **Theriogenology** 80:10-17.

Moraes FLZ, Morotti F, Costa CB, Lunardelli PA, Seneda MM (2019) Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology** 136:10-14.

Morotti F, Barreiros TRR, Machado FZ, González SM, Marinho LSR, Seneda MM (2015) Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction** 12:479-486.

Morotti F, Moretti R, Santos GMG, Silva-Santos KC, Cerqueira PHR, Seneda MM (2018) Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science** 188:170-177.

Morotti F, Santos GMG, Koetz Júnior C, Silva-Santos KC, Roso VM, Seneda MM (2017a) Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. **Theriogenology** 91:21-26.

Morotti F, Zangirolamo AF, da Silva NC, da Silva CB, Rosa CO, Seneda MM (2017b) Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction** 14:414-420.

Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans ACO (2013) Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biology of Reproduction** 88:92.

Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JHL, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ (2010) Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. **Reproduction** 140:713-720.

Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO (2012) Low numbers of ovarian follicles ≥ 3mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 95:2355-2361.

Nagai K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M (2015) Fertilizability of oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries. **Animal Reproduction Science** 163:172–178.

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** (Tokyo) 37:63-71.

Nogueira GP (2004) Puberty in South American Bos indicus (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science** 82-83:361-372.

Oliveira Júnior GA, Pinheiro VG, Fonseca PAS, Costa CB, PioltineEM, Botigelli RC, Razza EM, Ereno RL, Ferraz JBS, Seneda MM, Nogueira MFG (2021) Genomic and phenotypic analyses of antral follicle count in Aberdeen Angus cows. **Livestock Science** 249:104534.

Opsomer G, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A (1998) An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. **Reproduction in Domestic Animals** 33:193-204.

Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR (1992) Management considerations in heifer development and puberty. **Journal of Animal Science** 70:4018-35.

Pierson RA, Adams GP (1995) Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology** 43:105-112.

Pierson RA, Ginther OJ (1984) Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology** 21:495-504.

Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM (2003) Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science** 78:259-270.

Rico C, Fabre S, Médigue C, Di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D (2009) Antimullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of Reproduction** 80:50-59.

Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D (2011) Regulation of Anti-Mullerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels. **Biology of Reproduction** 84:560-571.

Romano MA, Barnabe VH, Kastelic JP, Oliveira CA, Romano RM (2007) Follicular dynamics in heifers during pre-pubertal and pubertal period kept under two levels of dietary energy intake. **Reproduction in Domestic Animals** 42:616-622.

Rosa CO, Marinho LSR, Da Rosa PRA, De Cesaro MP, Lunardelli PA, Santos KCS, 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 follicles. **Reproduction in Domestic Animals** 53:921-929.

Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S, La Marca A (2016) The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 33:95-100.

Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M (2019) Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-mullerian hormone during follicular growth in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology** 17:88.

Santa Cruz R, Cushman RA, Viñoles C (2018) Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. **Theriogenology** 119:35-42.

Santos GMGD, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, de Moraes FLZ, Blaschi W, Seneda MM (2016) 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** 165:17-21.

Sartori R, Barros CM (2011) Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** 124:244-250.

Sartori R, Bastos M, Baruselli PS, Gimenes LU, Ereno R, Barros C (2010) Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Ruminants** 67:357-375.

Sartori R, Gimenes LU, Monteiro Jr PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR (2016) Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology** 86:32-40.

Sartori R, Haughian J, Shaver R, Rosa G, Wiltbank M (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science** 87:905-20.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction & Fertility** 83:663-671.

Schams D, Schallenberger E, Gombe S, Karg H (1981) Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of Reproduction and Fertility** 30:103-10.

Schmauder S, Weber F, Kiossis E, Bollwein H (2008) Cyclic changes in endometrial echotexture of cows using a computer-assisted program for the analysis of first- and second-order grey level statistics of B-mode ultrasound images. **Animal Reproduction Science** 106:153-61.

Scully S, Evans ACO, Carter F, Duffy P, Lonergan P, Crowe MA (2015) Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. **Theriogenology** 83:449-458.

Semmelmann CEN, Lobato JFP, Rocha MG (2001) Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30:835-843.

Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DCM, Seneda MM (2014) 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** 49:228-232.

Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP (2004) A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology** 62:227-243.

Souza AH, Silva EPB, Cunha AP, Gumen A, Ayres H, Brusveen DJ. Guenther JN, Wiltbank MC (2011) Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology** 75:722-733.

Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel LC, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, Pate JL (2002) Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of Animal Science** 80:1053-1058.

Vandemark NL, Moeller AN (1951) Speed of spermatozoan transport in reproductive tract of estrous cow. **American Journal of Physiology** 165:674-679.

Vasconcelos GL, Cunha EV, Maculan R, Viafara JAS, Silva AWB, Batista ALS, Silva JRV, Souza JC (2020) 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** 217:106357.

Vrisman DP, Bastos NM, Rossi GF, Rodrigues NN, Borges LPB, Taira AR, Paz, CCP, Nogueira GP, Teixeira PPM, Monteiro, FM, Oliveira MEF (2018) Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology** 106:60-68.

Walsh SW, Mossa F, Butler ST, Berry DP, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Tempelman RJ, Carter F, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ (2014) Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science** 97:4503-4511.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ (2008) Androgen actions and the ovary. **Biology of Reproduction** 78:380-389.

Williams GL, Amstalden M (2010) Understanding postpartum anestrus and puberty in the beef female. **Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**, p. 55-71.

Zangirolamo AF, Morotti F, Silva NC, Sanches TK, Seneda MM (2018) Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction** 3:310-315.

CAPÍTULO 2 – Effect of follicular wave stage on potential fertility predictors and its repeatability coefficient in *Bos indicus* (Nellore) and *Bos taurus* (Caracu) prepubertal heifers[1]

ABSTRACT – As a step in the way to establish accessible methods for precocious individual selection based on phenotypic attributes related to reproductive superiority, this study evaluated the effects of follicular wave stages (emergence and dominance) and the repeatability coefficient of potential fertility predictors (vulvar morphometry, uterine biometry, echogenicity and echotexture, ovarian biometry and antral follicle count – AFC) in two purebred prepubertal heifers. Nellore (n = 30) and Caracu (n = 28) heifers were submitted to a sequence of eleven evaluation days conducted every 48 hours (D0 – random day of the antral follicular wave, until D20) to study the potential fertility indicators under natural conditions. Data obtained were compared according to breeds and follicular wave stages. Statistical analysis included fixed effects of breeds, evaluation days, and their statistical interaction, being performed by MIXED, GENMOD, GLM, and CORR procedures of the SAS statistical program. The breed was shown to influence rima height, ovarian area, and AFC, which were greater in Nellore heifers ($P < 0.02$). The follicular wave stage also influenced most of the potential predictors, highlighting the AFC, which showed to be greater in the dominant follicle (DF) presence in both breeds ($P < 0.0001$). The repeatability coefficient was considered high for vulvar width (0.76 and 0.66), ovarian area (0.70 and 0.62), and AFC (0.76 and 0.74) for Nellore and Caracu breeds, respectively. Only ovarian biometry was able to predict AFC (Pearson's correlations values above 0.66; $P < 0.0001$) in prepubertal heifers. The results indicate that most of the reproductive phenotypical attributes analyzed can be characterized by a single measure throughout prepuberty, as they are intrinsic to the individual.

Keywords: ovarian dynamics, antral follicular count, prepuberty, reproductive performance, biometry.

[1]Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Animal e encontra-se em avaliação para publicação.

1. Introduction

Research for innovations that ensure livestock profitability, especially through the improvement of reproductive efficiency, occurs in both bovine subspecies (*Bos indicus* and *Bos taurus*) to understand the zebu and taurine reproductive physiology and, through it, to establish accessible methods for individual selection based on phenotypic attributes related to reproductive superiority (Maculan et al., 2018). In addition, the application of these resources to select prepubertal females provides the early choice of those who, upon reaching puberty, will be more reproductively efficient.

In this context, the ultrasound advent allowed the characterization of bovine ovarian activity in successive follicular waves (Pierson and Ginther, 1984; Savio et al., 1988; Sirois and Fortune, 1988), which consists in the synchronous growth of a group of small antral follicles, followed by a dominant follicle (DF) selection and subordinate follicles regression (Ginther et al., 1989). Furthermore, significant variations were found in follicular dynamics between *Bos indicus* and *Bos taurus* (Baruselli et al., 2007; Sartori et al., 2016), as well as between the females' categories. Prepubertal heifers present follicular waves quantitatively different from postpubertal females, all being characterized as anovulatory, with shorter interwave interval and smaller mean dominant and first subordinate follicles diameters (Adams et al., 1994).

Given the knowledge advancement regarding ovarian population and dynamics in different bovine categories and subspecies, the antral follicle count (AFC) has been the main focus of studies that seek to identify whether this characteristic is predictive of the female reproductive potential. AFC is the ultrasound evaluation of the ovarian antral follicles number (≥ 2 mm), described as related to developmental parameters of early puberty manifestation (Santa Cruz et al., 2018) and to fertility (Zangirolamo et al., 2018). However, the relation between AFC and reproductive performance does not follow the same pattern through bovine subspecies. Taurine herds have presented better reproductive efficiency in females with greater AFC, regardless of biotechnology, while in zebu cattle such association differs according to the technique used (Morotti et al., 2017a). Despite this, AFC had shown high repeatability coefficient in the same animal (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007), which makes it a strategic method for

the characterization and selection of females regarding their potential to recruit follicles (Morotti et al., 2015).

Although being repeatable within individual, AFC is highly variable between animals (Burns et al., 2005), and cattle with different AFC have different reproductive characteristics (Martinez et al., 2016), such as ovarian response to superovulatory treatments (Ireland et al., 2007; Singh et al., 2004), hormonal concentrations (Ireland et al., 2007; Rico et al., 2009; Jimenez-Krassel et al., 2009), pregnancy rate, calving interval (Mossa et al., 2012), oocytes and embryos production (Ireland et al., 2008). However, regarding this attribute in prepubertal females and its repeatability at different follicular wave stages, there are still scarce and conflicting reports (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Gobikrushanth et al., 2017; Morotti et al., 2018), which justifies more detailed research about.

The number of antral follicles is positively associated with indirect fertility measures in cattle (Ireland et al., 2008). Among them, the anti-müllerian hormone circulating concentrations proved to be an important endocrine marker of the follicular population (Rico et al., 2009; Cardoso et al., 2018) which, while is a safe tool to predict AFC, the cost of its quantification is the biggest limitation for the use of this approach in herds (Cardoso et al., 2018). For this reason, other fertility predictors have been explored, especially those related to reproductive structures sizes, considered easy to use and described as correlated to the follicular population. For instance, we can mention ovarian and uterine biometry (Jimenez-Krassel et al., 2009; Morotti et al., 2018; De Lima et al., 2020) and vulvar morphometry (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018).

Ovary size and uterine thickness are considered useful indicators of sexual precocity (Monteiro et al., 2013) and ovarian reserve, being greater in females with high AFC (Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; Morotti et al., 2018; De Lima et al., 2020). Rima height and vulva width measures have also shown to act as ovarian follicular population and reproductive performance indicators, especially in zebu cattle (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018). Other morphofunctional changes that occur throughout the estrous cycle also allow predicting bovine fertility, especially those that affect the uterus. Uterine ultrasonography assessment combined

with computerized analysis can be a non-invasive, accurate, and accessible diagnosing tool (Schmauder et al., 2008) of the microstructure and chemical composition tissue (Chandolia et al., 1997), through the determination of its echogenicity and echotexture.

Therefore, the present study was carried out to determine whether the mentioned potential fertility predictors (vulvar morphometry, uterine biometry, echogenicity and echotexture, ovarian biometry, and AFC) are influenced by breed and by follicular wave stage, as well as to identify if such aspects are repeatable along the follicular wave of prepubertal heifers without strategies to control ovarian activity and test possible correlations among them.

2. Material and Methods

2.1 Location, animals, and management

The study was conducted in southeastern Brazil, at the Beef Cattle Research Center, Institute of Animal Science in Sertãozinho, SP, Brazil, located at 21º10'south latitude and 48º5'west longitude. Prepubertal Nellore (*Bos indicus*; n = 30) and Caracu (*Bos taurus*; n = 28) heifers were used. At the beginning of the study, the mean (± Std Dev) age of Nellore heifers was 468 ± 25 days (between 395 and 518 days) and for Caracu heifers, 468 ± 20 days (between 404 and 504 days). Nellore heifers weighed a mean (± Std Dev) of 236.7 ± 26.7 kg (between 186 and 284 kg), while Caracu heifers weighed 282.1 ± 25.9 kg (between 214 and 317 kg). All females had a body condition score between 3 and 6.5 (considering a scale of 1 to 9 for extremely thin and fat animals, respectively; Nicholson and Butterworth, 1986) and were kept in a rotational picket system, whose pasture was composed of *Brachiaria* grasses, with *ad libitum* mineral salt and water.

2.2 Experimental design

Prepubertal heifers were initially evaluated by B-Mode ovarian ultrasound to confirm the condition of prepubertal anestrus (i.e. absence of corpora lutea). A sequence of eleven evaluations was conducted every 48 hours, starting on Day 0 (D0 – random day of the antral follicular wave) until D20, to study the potential fertility predictors (vulvar morphometry, uterine biometry, echogenicity and echotexture, ovarian biometry, and AFC) of the selected females, concurrently, under natural conditions (Fig. 1). Intervals among observations were defined considering the follicular wave length and the duration of growth, plateau, and follicular atresia phases of prepubertal heifers described by Reis e Silva et al. (2005), so it was possible to assess follicular emergence and dominance stages.

Data obtained were compared according to the follicular wave stages (emergence and dominance), which were defined, respectively, by absence or presence of DF. The DF was considered as the largest follicle visualized in at least one of the ovaries, with a diameter ≥ 6.2 mm for Nellore (Gimenes et al., 2008) and ≥ 8.5 mm for Caracu breed, considering the pattern observed by Ginther et al. (1996) in taurine females.

2.2.1 Vulvar morphometry

Measurements of the external genitalia were performed with a pachymeter to obtain the rima height and the vulva width. Rima height (mm) was obtained from the distance between dorsal and ventral commissures and, further, the measurement of vulva width (mm) was made from one lateral edge to the other of the vulvar lips, considering the midpoint of rima height at a 90º angle, as described by Maculan et al. (2018).

2.2.2 Ultrasound evaluations

B-Mode ultrasound evaluations were conducted by the same operator using Mindray Z5® equipment (Mindray, Shenzhen, China) equipped with a linear transrectal transducer at 7.5 MHz frequency. Images and videos of the organs of interest were recorded to be reviewed and worked on according to the methodology recommended in each evaluation.

Ultrasound examination was conducted in the uterus to determine its biometry (uterine thickness) and assess the echogenicity and the echotexture of its wall. Uterine thickness (mm) was measured in a section made with the transducer in the middle third of the right uterine horn, and calculated by averaging three measurements of the distance between the edge of the endometrium lumen and the visualized interface among endometrium and myometrium (Souza et al., 2011) by Image J® software (National Institute of Health, NIH, USA).

The uterine echogenicity and echotexture were analyzed in digital images (bitmap) at a resolution of 768 x 576 pixels using the Image Pro Plus® 7.0TM software (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA, USA), with numerical pixel values in grayscale from 0 (absolute black) to 255 (absolute white). For each image, ten circular regions distributed through the organ parenchyma were sampled, covering only the endometrial tissue, avoiding myometrium and intrauterine fluid, if present. Through this analysis, the numerical pixel values (NPV – echogenicity) and the standard deviation of the numerical pixel values (Std Dev NPV – echotexture) were obtained.

For the study of ovarian biometry, measurements were taken of diameter (mm; mean vertical and horizontal cross-sectional diameter of the ovaries in their largest dimensions) and area (mm^2; calculated by the mean area of right and left ovaries in their largest dimensions; Monteiro et al., 2013) by ImageJ® software (National Institute of Health, NIH, USA). To determine the AFC, the ovaries were scanned ultrasonically from end to end to quantify the total number of antral follicles ≥ 2 mm in diameter, for each animal, by mapping the location of each structure present in both ovaries, as described by Ireland et al. (2008). The follicles classified as DF were identified and had

the diameter measured through the mean of the vertical and horizontal diameters in their largest dimensions (mm).

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistical Analysis System procedures (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). Variables were tested for normality, and none of the variables showed normal distribution. For the analysis of variance and correlation, the variables were transformed depending on the lambda value before statistical analysis to obtain the P values. The appropriate lambda value was obtained by Box-Cox transformation analysis using the TRANSREG procedure. The adjusted means and respective standard deviations (Std Dev) and standard errors (SEM) are shown on the original scale.

To assess the breed and the evaluation days effects, a linear repeated measures model (MIXED procedure) was adjusted and included the fixed effects of breed (1, 2), evaluation days (1, ...,11), interaction breed x day (1, ...,22) and animal age in the evaluation as a linear covariate. The repeated measures structure was modeled (REPEATED command) considering the autoregressive residual (co)variance structure with homogeneous variances (AR(1)). The repeated measures model to assess the presence of the DF effect included the fixed effects of breed (1, 2), DF (0: absence, 1: presence), interaction breed x DF (1, ..., 4), and the animal age in the evaluation as a linear covariate. The repeated measures structure was modeled as described above. Least squares means (LSMEANS) were compared between effects by means of the probability of difference (PDIFF) using t-Test. Statistical difference was declared when $P \leq 0.05$ and tendency was declared when $P \geq 0.06$ and < 0.10.

Pearson's correlations were estimated between the studied variables, by breed, considering the 11 assessments as independent observations. The repeatability coefficient was obtained as the ratio of the between-animal variance to the total variance (between-animal + within-animal). The variances were estimated in the MIXED procedure by adjusting the model that included the fixed effects of evaluation

(1, ..., 11), DF (0: absence, 1: presence), female's age in the evaluation as a linear covariate, and the random effects of the animal. The repeatability coefficient was considered as low (≤ 0.30), intermediate (> 0.30 and < 0.60) and high (≥ 0.60), as it ranges 0–1, where 1 = perfect (Boni et al., 1997).

3. Results

No female in the study presented corpora lutea during the evaluation days. The proportion of females that did not have any DF and those that had a DF within breed and between days showed that, on each evaluation day, at least 80% of Nellore and 46% of Caracu heifers had DF in at least one of the ovaries (Fig. 2). This result led us to investigate the variation in the DF diameter over the evaluation days, which is described in Fig. 3.

Variations in rima height (A), vulva width (B), uterine thickness (C), uterine echogenicity (D), uterine echotexture (E), ovarian diameter (F), ovarian area (G) and AFC (H) over the days are shown in Fig. 4. Nellore heifers in relation to Caracu had greater averages (± Std Dev) for rima height (82.2 ± 8.7 vs. 61.7 ± 7.6; P < 0.0001), ovarian diameter (16.3 ± 2.2 vs. 15.7 ± 2.2; P = 0.0392), ovarian area (225.4 ± 56.5 vs. 194.5 ± 50.3; P = 0.0004), AFC (30.2 ± 14.8 vs. 15.7 ± 8.2; P < 0.0001), and a tendency (P = 0.0542) to present greater vulva width (44.0 ± 5.6 vs. 42.1 ± 5.5) throughout the study.

Interaction means of absence or presence of DF and breed are shown in Fig. 5. In Nellore heifers, uterine echotexture was greater (P = 0.0484) when they had DF in relation to those without DF. In the Caracu breed, greater rima height (P = 0.0047), ovarian diameter (P = 0.0001), and ovarian area (P < 0.0001) were observed in females who had DF than those who did not have DF. For both Nellore and Caracu heifers, uterine thickness (P = 0.0457 and 0.0091, respectively) and AFC (P < 0.0001 and 0.0485, respectively) were greater when they had DF in comparison when they did not have DF.

Pearson's correlations of AFC with the other variables are shown in Table 1. The total number of ovarian follicles was shown to be positively correlated with ovarian biometry, and consequently with ovarian diameter and area in both breeds ($P < 0.0001$). Also, in the Caracu breed, AFC was correlated with uterine echotexture ($P = 0.0264$) as well as with DF diameter ($P = 0.0005$), which was correlated with ovarian diameter and area (0.31 and 0.27, respectively; $P < 0.0001$).

The repeatability coefficient was considered high for vulva width (0.76 and 0.66), ovarian area (0.70 and 0.62), and AFC (0.76 and 0.74) for Nellore and Caracu breeds, respectively (Table 2).

4. Discussion

To our knowledge, the present study was the first investigation that approached the AFC repeatability in different bovine subspecies and its relationship with other indirect fertility indicators in animals that have not reached puberty and sexual maturity yet, without any follicular wave synchronization that could influence the results. The most important difference in performing such analysis in prepubertal heifers under natural conditions and on random follicular wave stages is the absence of a physiological or induced event that can be used to synchronize the analysis and thus, establish relationships between the variables and reproductive phenomenon over the time.

Most of the females had a DF in at least one of the ovaries throughout the study period, since the DF dominance become more pronounced as puberty approaches (Driancourt, 2001), and the studied females were possibly in the peri-puberty period, considering their average age and weight (Day and Anderson, 1998), as well as their nutritional management and genetic merit. This fact can also be explained by the overlapping of the DF presence from different follicular waves, since the DF from the first wave starts to present evidence of atresia six days after the emergence of the second wave (Adams et al., 2008) and, for this reason, we can see the DF remaining from a wave in a subsequent one. As we did not find studies describing the diameter

deviation in the Caracu breed, we believe that the proportion of Caracu heifers with DF would be different if the follicle diameter established was greater or less than 8.5 mm reported by Ginther et al. (1996) for taurine cattle.

This result led us to investigate the variation in the DF diameter and, as expected, it was greater in the Caracu than in the Nellore breed, as the diameter deviation of DF is larger in *Bos taurus* than in *Bos indicus* (Ginther et al., 1996; Gimenes et al., 2008). In Nellore females, there was a variation in the DF diameter over the days, with growth and regression pattern similar to those observed in cyclic or pregnant cattle (Hopper et al., 1993) and to that described by De Lucia et al. (2002) in Nellore heifers at 8, 10, 12 and 14 months of age. Moreover, the DF diameter positively influenced AFC only in the Caracu breed, probably because as puberty approaches, the total antral follicles number (Evans et al., 1994) and the maximum DF diameter (Bergfeld et al., 1994; De Lucia et al., 2002) increase. We believe that such correlation was observed only in Caracu heifers because they were possibly closer to reaching puberty than Nellore, since taurine females become pubescent six to 12 months earlier than zebu heifers (Sartori et al., 2010).

Bovine external genitalia morphometry can vary according to reproductive status and subspecies, as *Bos indicus* females were described as having greater vulva width than *Bos taurus* (Maculan, 2018). This is in agreement with our findings, as the Nellore breed presented greater rima height and a tendency to present greater vulva width than the Caracu breed. Furthermore, greater rima height was observed in Caracu females that had DF, possibly because the DF has larger dimensions in this genetic group (Ginther et al., 1996) and higher steroidogenic capacity than other follicles (Ginther et al., 2001), capable of causing vulvar edema (Cheong and Gilbert, 2014) that may have influenced this measurement. There was no correlation between vulvar morphometry and AFC for Nellore and Caracu breeds, contradicting Mesquita et al. (2016) and Maculan et al. (2018), who described that Tabapuã (*Bos indicus*) females with greater rima height and vulva width have greater AFC. We believe that the adjacent mechanisms that regulate the correlation between AFC and vulvar evaluations are not well defined in prepubertal heifers and should become more pronounced with puberty. In both breeds, although the vulvar morphometry varied

along evaluation days, the repeatability coefficients of these measurements were considered intermediate to high.

Uterine biometry varied minimally and did not diverge between Nellore and Caracu heifers. The repeatability coefficient of this measure, however, was considered low for both breeds. This result indicates that uterine biometry varies through hormonal changes signaled between ovaries and uterus (Baerwald and Pierson, 2004), as described in Nellore heifers (Monteiro et al., 2013) and Holstein cows (Souza et al., 2011). There is a positive correlation between estradiol circulating concentrations and endometrial thickness (Souza et al., 2011), indicating that estradiol stimulates endometrial growth. Our data confirm the logic of these researches, as the largest uterine thickness was observed when heifers had DF and such structure was able to exert a greater stimulatory effect on the endometrial measure by its estradiol production (Ginther et al., 2001). Moreover, uterine thickness did not show any correlation with AFC, which disagrees with previous studies that affirm that cattle with a greater follicular population have an endometrium with increased thickness (Jimenez-Krassel et al., 2009). Such conflicting results can be due to the moment on which the endometrium was measured, the breed, the females' ages, and the ultrasound measurement's repeatability (Souza et al., 2011).

Uterine echogenicity (NPV) and echotexture (Std Dev NPV) evaluations were obtained according to the relative density (echotexture) or the tissue capacity to reflect (echogenic tissue – white) and transmit (non-echogenic tissue – black) an ultrasound beam (Chandolia et al., 1997), which can vary with the estrous cycle stage (Schmauder et al., 2008). During the most estrogenic phase, fluid is deposited in endometrium tissue spaces and, as it is hypoechoic in relation to other tissues, reduces overall uterine echogenicity values (Schmauder et al., 2008). Despite this, the relationship between echogenicity and follicular wave stage was not observed in our study. We speculate that the modulation by estradiol in the endometrial edema is not well established in prepubertal heifers, as their uterus may not have reached its full secretory capacity yet, since it is described as having lower height in heifers than in cows (Dhaliwal et al., 2002). Besides, due to the methodology used to evaluate the uterine ultrasound images, we avoided sampling regions where intrauterine fluid was

present, which probably also have contributed to the absence of significant interaction between this variable and follicular wave stages.

Studies in Nellore females show that estradiol is also in charge of regulating endometrial cell differentiation (Mesquita et al., 2015). Such alteration and the tissue chemical composition can be quantitatively accessed by each pixel density present in the image (Polat et al., 2015) and are identified as echotexture or heterogeneity (Sehgal, 1993). Our results indicated that only Nellore heifers presented greater echotexture values when they had DF in at least one of the ovaries, which corroborates with the researches mentioned above. Both uterus pixel evaluations for zebu and taurine females exhibited important variations throughout the days and extremely low repeatability coefficients, indicating that they are not a predictive tool applicable to prepubertal females at random follicular wave stage, although they are useful to recognize uterine changes (Schmauder et al., 2008).

Ovarian biometry proved to be able to predict AFC for both breeds, which is in agreement with previous studies that report a high correlation between ovarian size and follicular population in dairy cows ($r = 0.86$; Modina et al., 2014) and beef heifers ($r = 0.51$ and 0.40; Eborn et al., 2013). More recently, Morotti et al. (2018) and De Lima et al. (2020) also observed superior ovarian diameter, perimeter, and area in Nellore females with high AFC (≥ 45 follicles). Such findings indicate that a larger ovarian cortical mass is needed to support the growth of a high number of follicles (Cushman et al., 2009). The presence of DF was also shown to be an important factor that affects ovarian diameter and area in Caracu heifers, since such measures were bigger in the DF presence and its diameter was also correlated with both biometric variables. We hypothesize that, in addition to ACF, the greater DF diameter, the greater ovarian space is required for this structure, which seems to influence mainly taurine females. Greater ovarian area of Nellore heifers in most of the study days compared to Caracu is for the greater AFC that *Bos indicus* females have than *Bos taurus* (Sartori et al., 2016) and the positive correlation of this count with the ovarian size. Moreover, both ovarian measures exhibited repeatability coefficient values intermediate to high for both subspecies, which was also verified by Cushman et al. (2009) who, despite having analyzed the ovarian weight, found that it can be measured at any cycle phase and requires less time and operator ability than AFC (Mossa et al., 2012).

The AFC is considered a reflection of ovarian reserve size (Ireland et al., 2008) and is highly variable among animals (Burns et al., 2005), mostly due to females' genetic group. Studies indicate that zebu cattle recruit a greater follicles number than taurine (Alvarez et al., 2000; Carvalho et al., 2008; Sartori et al., 2016). This pattern was also verified in our research, as Nellore heifers had a greater total amount of follicles in both ovaries compared to Caracu in all evaluation days. Differences in circulating concentrations of insulin-like growth factor I (IGF-I) and sensitivity to follicle stimulating hormone (FSH) support the main assumption of variation causes in AFC between subspecies (Alvarez et al., 2000; Sartori and Barros, 2011; Sartori et al., 2016). The authors reported that *Bos indicus* females have greater IGF-I circulating concentrations which, consequently, increase the sensitivity of small follicles to gonadotropins (Sartori et al., 2016) and result in greater follicular recruitment in this group (Alvarez et al., 2000). They also justify that zebu animals have lower hepatic steroid metabolism and higher ovarian steroid production than taurine (Sartori et al., 2016), which directly impacts the divergent follicular number and development between breeds.

This count was greater in the presence of an ultrasonically visualized DF in both breeds due to the wave that is emerging intersects with the wave that is in atresia (Adams et al., 2008), and the assigned intersection is more important in prepubertal heifers, as their interwave intervals are shorter than described in pubertal females (Adams et al., 1994). Thus, it is possible to identify follicles that are in the process of atresia concurrently with other follicular wave stages, indicating that AFC can remain greater even in the dominance phase of the follicular wave. Also, since the feedback mechanism between estradiol and gonadotropins is not well established in prepubertal females (Day et al., 1984; Day et al., 1987; Bergfeld et al., 1994), this hormone is probably not efficient to reduce FSH synthesis and secretion to the point when it is insufficient to support the growth of subordinate follicles (Ginther et al., 1996) and causes their atresia.

Additionally, the AFC repeatability values of both breeds were considered high (0.76 and 0.74, for Nellore and Caracu heifers, respectively) despite the high follicular count variability among females (from one to 89 follicles in Nellore and from three to 48 follicles in Caracu). Such data agree with not only older literature findings, whose

follicular recruitment repeatability was 0.58 (Boni et al., 1997), but also with more recent works, which noted even greater repeatability coefficient (0.85) in Nellore and Holstein heifers submitted to three evaluations with 60-day intervals between them (Batista et al., 2014). Morotti et al. (2017b) also confirmed the high AFC repeatability (0.89 to 0.92) in prepubertal Braford females from weaning to yearling ages. High repeatability values indicate that the number of follicles recruited in the ovaries is previously regulated by the individual and is established by a chronic compensatory mechanism (Burns et al., 2005), which can be interesting for animal selection in breeding programs. It also allows females classification into categories according to their follicular population (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007) on a single ultrasound assessment (Singh et al., 2004) and, considering the present study conditions, on random follicular wave stages.

These results indicate that, even influenced by the follicular wave stage, AFC had high repeatability in prepubertal heifers considering the studied days. This finding is consistent with recent research performed in Nellore females with high (≥ 45 follicles) and low (≤ 15 follicles) AFC, which exhibited a high repeatability value (0.93) during the entire evaluation period (Morotti et al., 2018). The high AFC repeatability (0.95 and 0.84, respectively) was also described when it was determined approximately at wave emergence within the same estrous cycle or during consecutive estrous cycles in dairy and beef cattle (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007). In contrast, Gobikrushanth et al. (2017) found that the highest AFC in lactating Holstein cows was on a random estrous cycle day than on expected day of follicular wave emergence and its repeatability was lower (0.37) compared to those presented by other cited studies. The present study performed the ovarian antral follicles determination in 11 arbitrary days under natural reproductive conditions and exhibited greater repeatability results.

In conclusion, vulvar morphometry, ovarian biometry, and AFC repeatability values strongly indicate that a single measurement at an unknown follicular wave stage can be able to characterize prepubertal heifers. The breed was shown to influence rima height, ovarian area, and AFC, being greater in Nellore heifers. The follicular wave stage interfered in most of the variables (rima height, uterine thickness, uterine echotexture, ovarian biometry, and AFC), highlighting the AFC, which showed to be greater in the DF presence for both breeds. Ovarian biometry is capable of predicting

AFC, an essential finding for the optimization of field evaluations. The results showed that a single measure throughout prepuberty is sufficient to characterize most fertility predictors, as they are intrinsic to the individual. Also, it will serve for future studies to associate those attributes with more direct fertility measures, such as pregnancy and calving rates, and puberty onset, becoming it possible to make an early decision on young heifers' selection based on their reproductive superiority.

Implications

The study enabled not only the description of phenotypical reproductive attributes in prepubertal heifers of different subespecies, but also the knowledge about how they behave throughout such heifers' follicular waves. Most of the fertility predictors can characterize zebu and taurine heifers in a single measure, due to their repeatability values, indicating that they are intrinsic to the individual. The results found will possibly serve as a basis for future researches to determine whether such assessments are directly associated with fertility and, thus, ensuring the early choice of females that will have better reproductive performance when they reach sexual maturity.

Ethics approval

All procedures related to animals were approved by the Ethics Committee of the School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, Brazil with the number of protocol (015953/18).

Data and model availability statement

None of the data was deposited in an official repository.

Author contributions

J.R. Bevilaqua: data collection, methodology, evaluations, statistical analysis, and manuscript writing. N.N. Rodrigues: data collection and methodology. G.F. Rossi:

methodology. M.A.F. Pupin: data collection. M.O. Silva: data collection. M.S. Borges: data collection. L.G. Fernandes: data collection. M.E.Z. Mercadante: methodology, statistical analysis, and manuscript writing. F.M. Monteiro: methodology, statistical analysis, and manuscript writing. M.E.F. Oliveira: study conceptualization, methodology, statistical analysis, and manuscript writing.

Declaration of interest

None.

Acknowledgments

We thank the Beef Cattle Research Center, Institute of Animal Science, Sertãozinho, SP, Brazil, for providing the animals and infrastructure for the study.

Financial support statement

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil (#2017/50339-5), and by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Finance Code 001, for providing grants for J.R. Bevilaqua, N.N. Rodrigues, G.F. Rossi, M.A.F. Pupin, M.O. Silva, M.S. Borges, and L.G. Fernandes).

5. References

Adams, G.P., Evans, A.C.O., Rawlings, N.C., 1994. Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month-old prepubertal heifers. Journal of Reproduction and Fertility 100, 27-33. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000027

Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology 69, 72-80. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026

Alvarez, P., Spicer, L.J., Chase, C.C., Payton, M.E., Hamilton, T.D., Stewart, R.E., Hammond, A.C., Olson, T.A., Wettemann, R.P., 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. Journal of Animal Science 78, 1291-1302. https://doi.org/10.2527/2000.7851291x

Baerwald, A.R., Pierson, R.A., 2004. Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 24, 453-460. https://doi.org/10.1002/uog.1123

Baruselli, P.S., Gimenes, L.U., Sales, J.N.S., 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. Revista Brasileira de Reprodução Animal 31, 205-211. http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/205.pdf

Batista, E.O., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M.D., Sá Filho, M.F., Del Valle, T.A., Jesus, E.F., Lopes, R.N., Renno, F.P., Baruselli, P.S, 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. Reproduction in Domestic Animals 49, 448-452. https://doi.org/10.1111/rda.12304

Bergfeld, E.G.M., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Garcia-Winder, M.,Kinder, J.E., 1994. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. Biology of Reproduction 51, 1051-1057. https://doi.org/10.1095/biolreprod51.5.1051

Boni, R., Roelofsen, M.W.M., Pieterse, M.C., Kogut, J., Kruip, T.A.M., 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. Theriogenology 48, 277-289. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)84075-7

Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle stimulating hormone concentrations. Biology of Reproduction 73, 54-62. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277

Cardoso, C.J.T., Oliveira Junior, J.S., Kischel, H., Silva, W.A.L, Arruda, E.D.S., Souza-Cáceres, M.B., Oliveira, F.A.M., Nogueira, E., Nogueira, G.P., Melo-Sterza, F.A., 2018. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicule population in heifers. Animal Reproduction 15, 12-16. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR887

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

Chandolia, R.K., Bartlewski, P.M., Omeke, B.C., Beard, A.P., Rawlings, N.C., Pierson, R.A., 1997. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. Theriogenology 48, 99-117. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00194-5

Cheong, S.H., Gilbert, R.O., 2014. Massive vulvar edema in 2 prepartum dairy cows. The Canadian Veterinary Journal 55, 462-465. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992307/

Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C., 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. Journal of Animal Science 87, 1971-1980. https://doi.org/10.2527/jas.2008-1728

Day, M.L., Anderson, L.H., 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. Journal of Animal Science 76, 1-15. https://doi.org/10.2527/1998.76suppl_31x

Day, M.L., Imakawa, K., Garcia-Winder, M., Zalesky, D.D., Schanbacher, C.D., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1984. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduction 31, 332-341. https://doi.org/10.1095/biolreprod31.2.332

Day, M.L., Imakawa, K., Wolfe, P.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduciton 37,1054-1065. https://doi.org/10.1095/biolreprod37.5.1054

De Lucia, R.F.S., Pereira, F.V., Nogueira, G.P., 2002. Follicular population in precocious and non precocious Nellore heifers during prepubertal period. Theriogenology 57, 603. https://scholargoogle.com/theriogenology.2002

Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Rees, E.M., Howard, C.V., Beech, D.J., 2002. Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. Research in Veterinary Science 73, 259-65. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00098-X

Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology 55, 1211-1239. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4

Eborn, D.R., Cushman, R.A., Echternkamp, S.E., 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. Journal of Animal Science 91, 4168-4179. https://doi.org/10.2527/jas.2012-5877

Evans, A.C.O, Adams, G.P., Rawlings, N.C., 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. Journal of Reproduction and Fertility 102, 463-470. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1020463

Gimenes, L.U., Sa, M.F., Carvalho, N.A.T., Torres, J.R.S., Souza, A.H., Madureira, E.H., Trinca, L.A., Sartorelli, E.S., Barros, C.M., Carvalho, J.B.P., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S., 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. Theriogenology 69, 852-858. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001

Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Knot, K, 2001. Follicle selection in monovular species. Biology of Reproduction 65, 638-647. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.638

Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrous cycle. Animal Reproduction Science 20, 187-200. https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90084-5

Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. Biology of Reproduction 55, 1187-1194. https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1187

Gobikrushanth, M., Dutra, P.A., Bruinjé, T.C., Colazo, M.G., Butler, S.T., Ambrose, D.J., 2017. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. Theriogenology 92, 90-94. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018

Hopper, H.W., Silcox, R.W., Byerley, D.J., Kiser, T.E., 1993. Follicular development in prepubertal heifers. Animal Reproduction Science 31, 7-12. https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90022-J

Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. 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 22, 1687-1695. https://doi.org/10.1093/humrep/dem071

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

Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland,J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. Biology of Reproduction 80, 1272-1281. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093

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

Maculan, R., Pinto, T.L.C., Moreira, G.M., Vasconcelos, G.L., Sanches, J.A., Rosa, R.G., Bonfim, R.R., Gonçalves, T.M., Souza, J.C., 2018. Anti-mullerian hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. Animal Reproduction Science 189, 84-92. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.011

Maculan, R., 2018 Utilização de características indicadoras de fertilidade na predição do potencial reprodutivo de fêmeas e machos *Bos taurus* e *Bos indicus.* PhD thesis – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil.

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

Mesquita, F.S., Ramos, R.S., Pugliesi, G., Andrade, S.C.S., Van Hoeck, V., Langbeen, A., Oliveira, M.L, Gonella-Diaze, A.M., Gasparain, G., Fukumasu, H., Pulz, L.H., Membrive, C.M., Coutinho, L.L., Binelli, M., 2015. The receptive endometrial transcriptome signature indcatesna earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow. Biology of Reproduction 2, 1-12. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129031

Mesquita, N.F., Maculan, R., Maciel, L.F.S., Alves, N., De Carvalho, R.R., Moreira, G.M., De Souza, J.C., 2016. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. Journal of Reproduction and Development 62, 587-590. https://doi.org/10.1262/jrd.2016-059

Modina, S.C., Tessaro, I., Lodde, V., Franciosi, F., Corbani, D., Luciano, A.M., 2014. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. Reproduction, Fertility and Development 26, 235-244. https://doi.org/10.1071/RD12295

Monteiro, F.M., Mercadante, M.E.Z., Barros, C.M., Satrapa, R.A., Silva, J.A.V., Oliveira, L.Z., Saraiva, N.Z., Oliveira, C.S., Garcia, J.M., 2013. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. Theriogenology 80, 10-17. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.013

Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.Z., González, S.M., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M., 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? Animal Reproduction 12, 479-486. https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6033f7783717068b4612/pdf/animreprod-12-3-479.pdf

Morotti, F., Moretti, R., Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Cerqueira, P.H.R., Seneda, M.M., 2018. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. Animal Reproduction Science 188, 170-177. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001

Morotti, F., Zangirolamo, A.F., da Silva, N.C., da Silva, C.B., Rosa, C.O., Seneda, M.M., 2017a. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, Animal Reproduction 14, 414-420. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR994

Morotti, F., Santos, G.M.G., Koetz Júnior, C., Silva-Santos, K.C., Roso, V.M., Seneda, M.M., 2017b. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. Theriogenology 91, 21-26. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.025

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

Nicholson, M.J., Butterworth, M.H., 1986. A guide to condition scoring of zebu cattle. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 29. Retrieved on 19 July 2021 from https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNAAV664.pdf

Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. Theriogenology 21, 495-504. https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90411-4

Polat, B., Cengiz, M., Cannazik, O., Colak, A., Oruc, E., Altun, S., Salar, S., Bastan, A., 2015. Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. Animal Reproduction Science 155, 50-55. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.015

Reis e Silva, A.R.,de los Reyes, A., Gmbarini, M.L., Rumpf, R., Oliveira, C.C., Oliveira Filho, B.D., 2005. Dinâmica folicular por ultra-sonografía em novilhas pré-púberes da raça Gir. Archivos latinoamericanos de producción animal 13, 51-55. Retrieved on 19 July 2021 from https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13675/5/Artigo%20%20Adriana%20Rodrigues%20Reis%20e%20Silva%20-%202005.pdf

Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.F., Monniaux, D., 2009. Antimullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. Biology of Reproduction 80, 50-59. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157

Santa Cruz, R., Cushman, R.A., Viñoles, C., 2018. Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. Theriogenology,119:35-42. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.010

Sartori, R., Barros, C.M., 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. Animal Reproduction Science 124, 244-250. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006

Sartori, R., Bastos, M.R., Baruselli, P.S., Gimenes, L.U., Ereno, R.L., Barros, C.M., 2010. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. Reproduction in Domestic Ruminants 6, 357-75. https://doi.org/10.5661/RDR-VII-357

Sartori, R., Gimenes, L.U., Monteiro Jr, P.L.J., Melo, L.F., Baruselli, P.S., Bastos, M.R., 2016. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. Theriogenology 86, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016

Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. Reproduction, Fertility and Development 83, 663-671. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830663

Schmauder, S., Weber, F., Kiossis, E., Bollwein, H., 2008. Cyclic changes in endometrial echotexture of cows using a computer-assisted program for the analysis of first- and second-order grey level statistics of B-mode ultrasound images. Animal Reproduction Science 106, 153-161. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.022

Sehgal, C.M., 1993. Quantitative relationship between tissue composition and scattering of ultrasound. Journal of the Acoustical Society of America 94, 1944-1952. https://doi.org/10.1121/1.407517

Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. Theriogenology 62, 227-243.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020

Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. Biology of Reproduction 39, 308-317. https://doi.org/10.1095/biolreprod39.2.308

Souza, A.H., Silva, E.P.B., Cunha, A.P., Gumen, A., Ayres, H., Brusveen, D.J., Guenther, J.N., Wiltbank, M.C., 2011. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. Theriogenology 75, 722-733. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.013

Zangirolamo, A.F., Morotti, F., Silva, N.C., Sanches, T.K., Seneda, M.M., 2018. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. Animal Reproduction 3, 310-315. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0072

Table 1 Pearson's correlations of antral follicle count (AFC) with the potential fertility predictors evaluated at random follicular wave stages of prepubertal Nellore and Caracu heifers.

	Rima height (mm)	Vulva width (mm)	Uterine thickness (mm)	Uterine echogenicity (NPV)	Uterine echotexture (Std Dev NPV)	Ovarian diameter (mm)	Ovarian area (mm^2)	DF diameter (mm)
NELLORE	NS	NS	NS	NS	NS	0.75	0.75	NS
CARACU	NS	NS	NS	NS	0.13	0.67	0.66	0.23

P < 0.04. NS = Not significant (P > 0.05). NPV – Numerical Pixel Values.

Table 2 Repeatability coefficient of potential fertility predictors evaluated at random follicular wave stages of prepubertal Nellore and Caracu heifers.

	Rima height (mm)	Vulva width (mm)	Uterine thickness (mm)	Uterine echogenicity (NPV)	Uterine echotexture (Std Dev NPV)	Ovarian diameter (mm)	Ovarian area (mm^2)	AFC
NELLORE	0.53	0.76	0.16	0.07	0.10	0.69	0.70	0.76
CARACU	0.71	0.66	0.25	0.20	0.22	0.57	0.62	0.74

$P < 0.04$.

Figure captions

Fig. 1. Experimental design performed to evaluate the follicular wave stage effect (emergence and dominance) on potential fertility predictors and its repeatability of *Bos indicus* (Nellore) and *Bos taurus* (Caracu) prepubertal heifers.

Fig. 2. Proportion of Nellore (A) and Caracu (B) heifers, per evaluation day, that did not have (Without DF) or had (With DF) a dominant follicle (DF) in at least one of the ovaries.

Fig. 3. Mean (± SEM) of dominant follicle (DF) diameter in prepubertal Nellore and Caracu heifers, per evaluation day. Values followed by superscript lowercase letters (^{ab}) indicate significant differences ($P < 0.05$) between days in the same breed. Values followed by a superscript asterisk (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) between breeds on the same day.

Fig. 4. Mean (± SEM) of rima height (A), vulva width (B), uterine thickness (C), uterine echogenicity (D), uterine echotexture (E), ovarian diameter (F), ovarian area (G), and AFC (H) evaluated for eleven days every 48 hours at random follicular wave stages of prepubertal Nellore and Caracu heifers. Values followed by superscript lowercase letters (^{ab}) indicate significant differences ($P < 0.05$) between days in the same breed. Values followed by superscript asterisk (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) between breeds on the same day.

Fig. 5. Mean (± SEM) of the interaction of rima height (A), vulva width (B), uterine thickness (C), uterine echogenicity (D), uterine echotexture (E), ovarian diameter (F), ovarian area (G) and AFC (H) with the absence or presence of dominant follicle (DF) and between the Nellore and Caracu breeds. Lowercase letters (^{ab}) indicate significant differences ($P < 0.05$) between the follicular wave stages (absence and presence of

DF) in the same breed. Uppercase letters (^{AB}) indicate significant differences ($P < 0.05$) between breeds in the same follicular wave stage (absence or presence of DF).

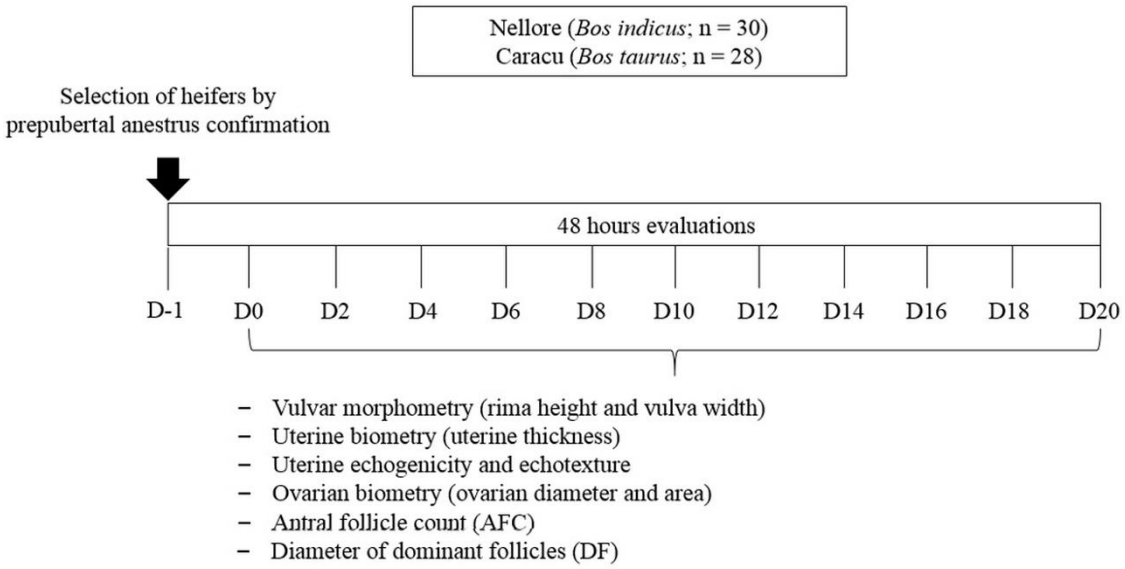

Nellore (*Bos indicus*; n = 30)
Caracu (*Bos taurus*; n = 28)
Selection of heifers by prepubertal anestrus confirmation
48 hours evaluations
D-1
D0
D2
D4
D6
D8
D10
D12
D14
D16
D18
D20
– Vulvar morphometry (rima height and vulva width)
– Uterine biometry (uterine thickness)
– Uterine echogenicity and echotexture
– Ovarian biometry (ovarian diameter and area)
– Antral follicle count (AFC)
– Diameter of dominant follicles (DF)

Fig. 1.

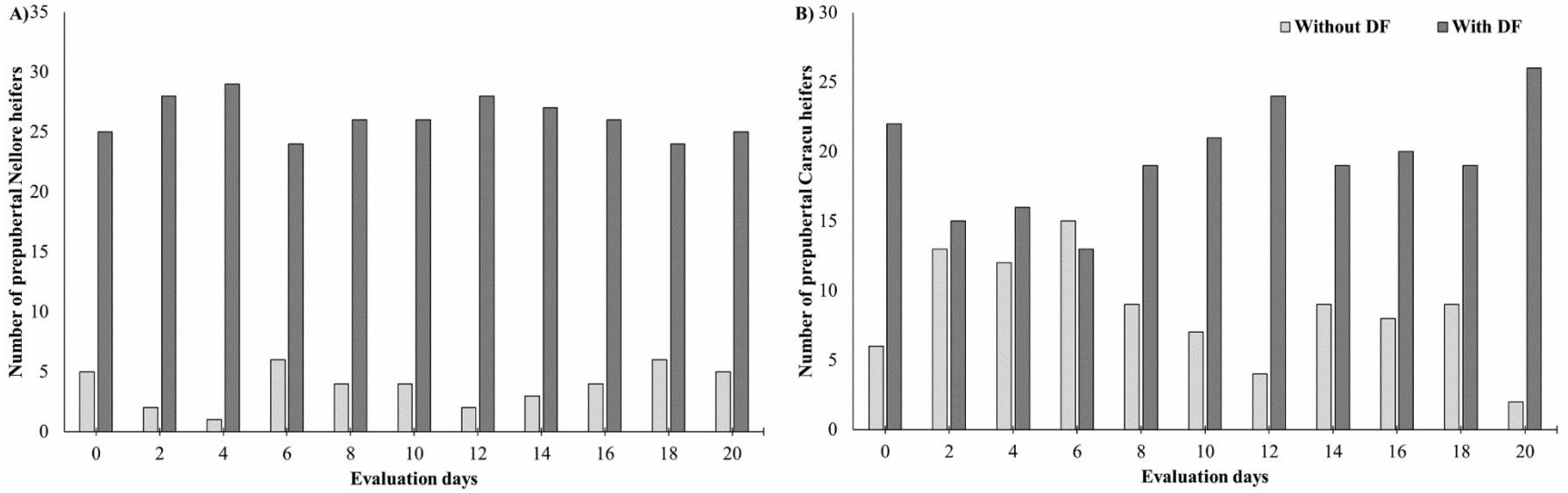

A)
Number of prepubertal Nellore heifers
Evaluation days
B)
Without DF
With DF
Number of prepubertal Caracu heifers
Evaluation days

Fig. 2.

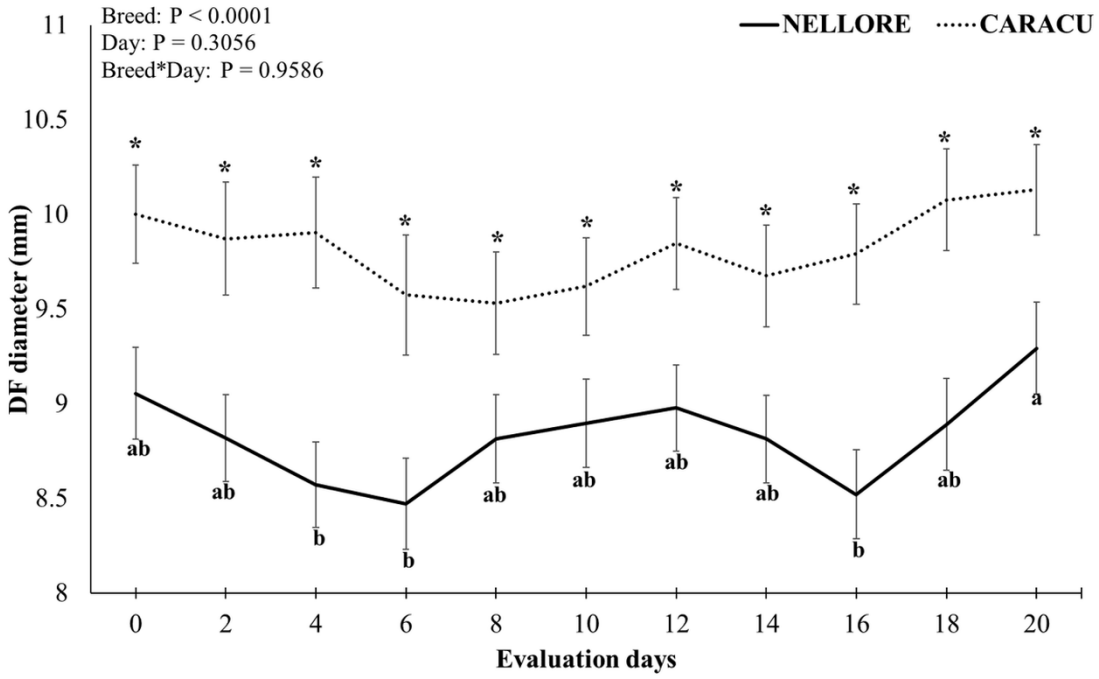

Breed: P < 0.0001
Day: P = 0.3056
Breed*Day: P = 0.9586
NELLORE
CARACU
DF diameter (mm)
Evaluation days
11
10.5
10
9.5
9
8.5
8
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
ab
ab
b
b
ab
ab
ab
ab
b
ab
a

Fig. 3.

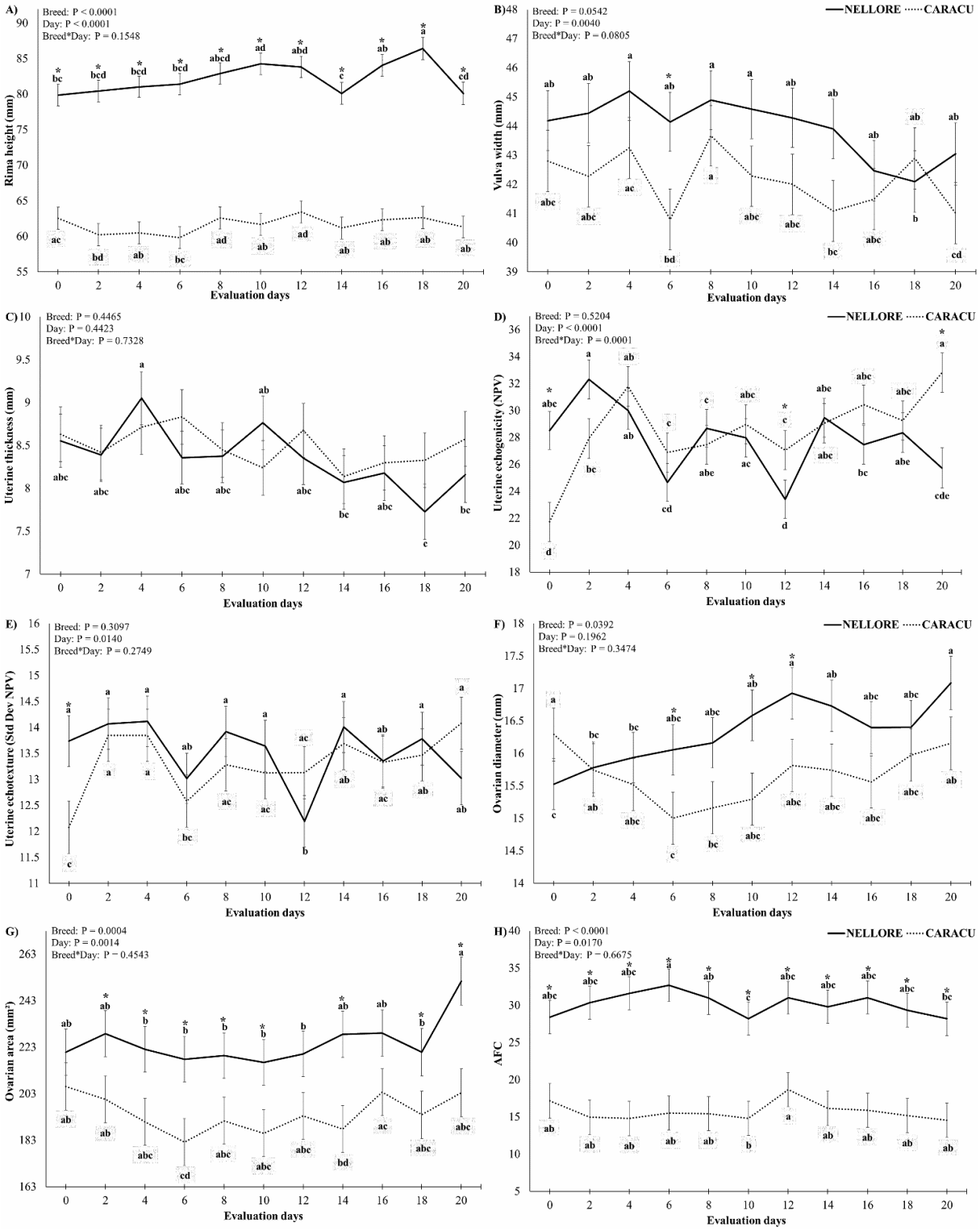

A)
Breed: P < 0.0001
Day: P < 0.0001
Breed*Day: P = 0.1548
Rima height (mm)
Evaluation days
B)
Breed: P = 0.0542
Day: P = 0.0040
Breed*Day: P = 0.0805
NELLORE CARACU
Vulva width (mm)
Evaluation days
C)
Breed: P = 0.4465
Day: P = 0.4423
Breed*Day: P = 0.7328
Uterine thickness (mm)
Evaluation days
D)
Breed: P = 0.5204
Day: P < 0.0001
Breed*Day: P = 0.0001
NELLORE CARACU
Uterine echogenicity (NPV)
Evaluation days
E)
Breed: P = 0.3097
Day: P = 0.0140
Breed*Day: P = 0.2749
Uterine echotexture (Std Dev NPV)
Evaluation days
F)
Breed: P = 0.0392
Day: P = 0.1962
Breed*Day: P = 0.3474
NELLORE CARACU
Ovarian diameter (mm)
Evaluation days
G)
Breed: P = 0.0004
Day: P = 0.0014
Breed*Day: P = 0.4543
Ovarian area (mm²)
Evaluation days
H)
Breed: P < 0.0001
Day: P = 0.0170
Breed*Day: P = 0.6675
NELLORE CARACU
AFC
Evaluation days

Fig. 4.

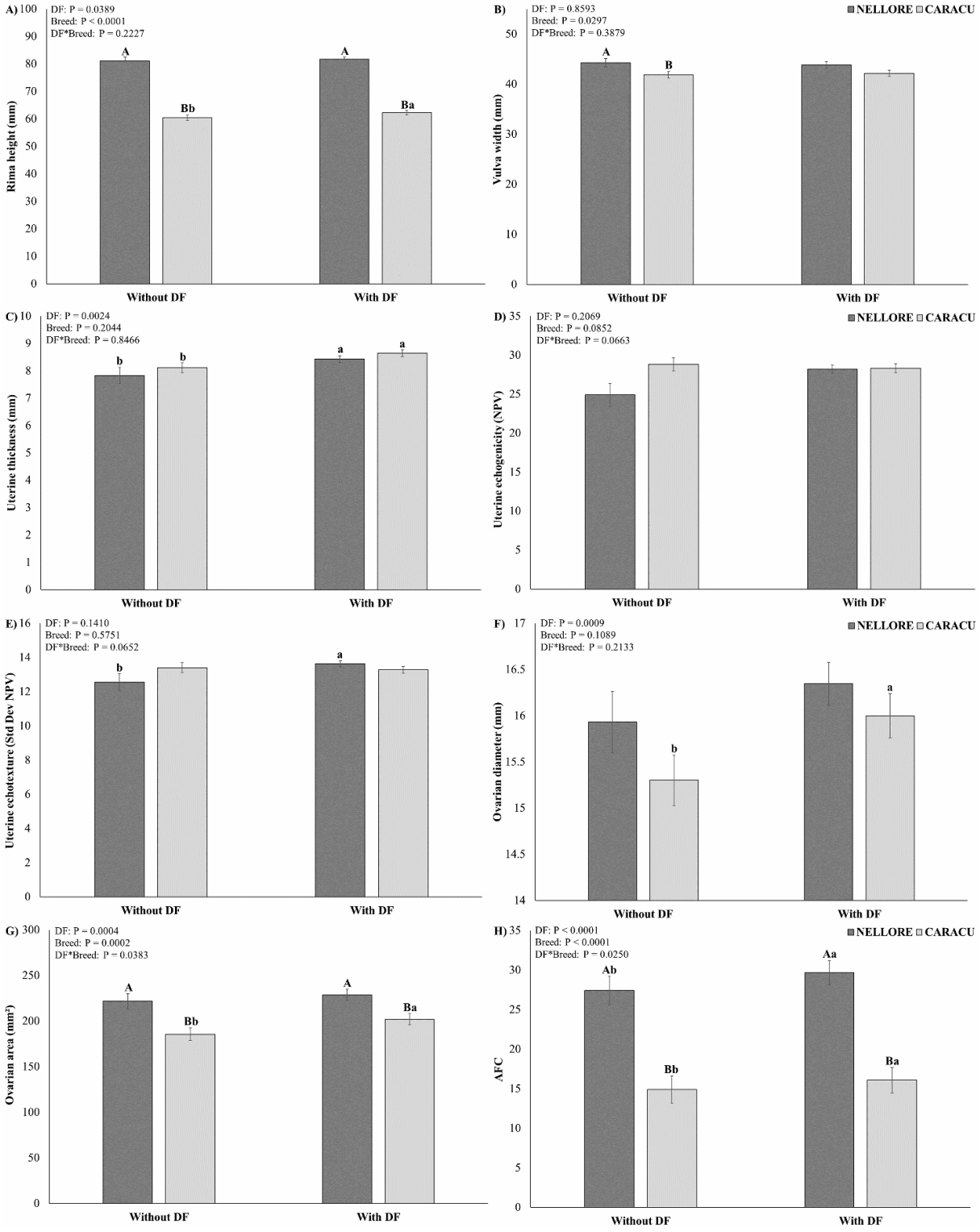

A)
DF: P = 0.0389
Breed: P < 0.0001
DF*Breed: P = 0.2227
Rima height (mm)
A
Bb
A
Ba
Without DF
With DF
B)
DF: P = 0.8593
Breed: P = 0.0297
DF*Breed: P = 0.3879
NELLORE CARACU
Vulva width (mm)
A
B
Without DF
With DF
C)
DF: P = 0.0024
Breed: P = 0.2044
DF*Breed: P = 0.8466
Uterine thickness (mm)
b
b
a
a
Without DF
With DF
D)
DF: P = 0.2069
Breed: P = 0.0852
DF*Breed: P = 0.0663
NELLORE CARACU
Uterine echogenicity (NPV)
Without DF
With DF
E)
DF: P = 0.1410
Breed: P = 0.5751
DF*Breed: P = 0.0652
Uterine echotexture (Std Dev NPV)
b
a
Without DF
With DF
F)
DF: P = 0.0009
Breed: P = 0.1089
DF*Breed: P = 0.2133
NELLORE CARACU
Ovarian diameter (mm)
b
a
Without DF
With DF
G)
DF: P = 0.0004
Breed: P = 0.0002
DF*Breed: P = 0.0383
Ovarian area (mm²)
A
Bb
A
Ba
Without DF
With DF
H)
DF: P < 0.0001
Breed: P < 0.0001
DF*Breed: P = 0.0250
NELLORE CARACU
AFC
Ab
Bb
Aa
Ba
Without DF
With DF

Fig. 5.