

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**RELATIONSHIPS OF PREPUBERTAL SOMATIC
DEVELOPMENT AND
MORPHOLOGICAL/ULTRASONOGRAPHIC ATTRIBUTES
OF THE REPRODUCTIVE ORGANS IN NELLORE HEIFERS
WITH TIMING OF THE FIRST CALVING**

**Naiara Nantes Rodrigues
Médica Veterinária, Msc.**

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**RELATIONSHIPS OF PREPUBERTAL SOMATIC
DEVELOPMENT AND
MORPHOLOGICAL/ULTRASONOGRAPHIC ATTRIBUTES
OF THE REPRODUCTIVE ORGANS IN NELLORE HEIFERS
WITH TIMING OF THE FIRST CALVING**

Discente: Naiara Nantes Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Área: Reprodução Animal).

2023

R696r

Rodrigues, Naiara Nantes

Relationships of prepubertal somatic development and morphological/ultrasonographic attributes of the reproductive organs in Nellore heifers with timing of the first calving / Naiara Nantes Rodrigues. -- Jaboticabal, 2023
65 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientador: Fábio Morato Monteiro

1. bovinos. 2. contagem de folículos antrais. 3. fertilidade. 4. morfometria vulvar. 5. ultrassonografia. 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).

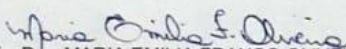
Essa ficha não pode ser modificada.

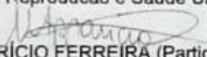
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

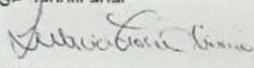
TÍTULO DA TESE: RELATIONSHIPS OF PREPUBERTAL SOMATIC DEVELOPMENT AND MORPHOLOGICAL/ULTRASOGRAPHIC ATTRIBUTES OF THE REPRODUCTIVE ORGANS IN NELLORE HEIFERS WITH TIMING OF THE FIRST CALVING

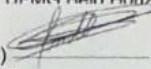
AUTORA: NAIARA NANTES RODRIGUES
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO

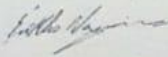
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. LETÍCIA ZOCCOLARO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / IIFMG Belo Horizonte/MG


Prof. Dr. FABIO MOROTTI (Participação Virtual)
Depto. de Clínicas Veterinárias / UEL Londrina/PR


Prof. Dr. ÉRIKLIS NOGUEIRA (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (EMBRAPA) / Corumba/MS

Jaboticabal, 10 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NAIARA NANTES RODRIGUES – nascida em Batayporã - MS, aos 18 dias do mês de julho de 1990. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Nair Palácio de Souza, na cidade de Nova Andradina - MS, em dezembro de 2007. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT Câmpus de Sinop - MT, em julho de 2008. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em setembro de 2013. Cursou Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, de março de 2016 a maio de 2018, sob orientação da Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira, com bolsa da CAPES. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, em julho de 2018, sob orientação da Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira, com bolsa da CAPES.

“Aqueles que confiam no Senhor são como os montes de Sião, que não se abalam, mas permanecem para sempre”
(BÍBLIA, Salmo 125)

Dedico esse trabalho a minha mãe ELIETE PAES NANTES por todo apoio e carinho. E *in memoriam* ao meu avô ONOFRE NANTES, avó HERCÍLIA PAES NANTES e ao meu pai ROSALVO RODRIGUES.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos recebidas até aqui, por todo amor dedicado a essa sua filha e por me dar a força necessária para continuar caminhando!

A minha mãe Eliete Paes Nantes pelo amor e apoio incondicional em todas as decisões. Obrigada por sempre estar ao meu lado. Amo você!

A meu noivo André Santos de Oliveira Junior pelo companheirismo, amor, apoio e paciência durante esse período. Amo você!

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria Emilia Franco Oliveira pela orientação em todo período de pós-graduação. Obrigada pela contribuição profissional.

Ao meu coorientador Dr. Fabio Morato Monteiro pela coorientação, por ceder laboratório e animais para que pudesse realizar a coleta dos dados no campo.

A todos os profissionais do Instituto de Zootecnia envolvidos neste trabalho, pela ajuda, apoio e colaboração no desenvolvimento deste estudo. Em especial aos campeiros Fran, Flávio, Dal, Pedro, Valdir pelo dia a dia no campo na condução de toda a parte experimental.

Aos Professores e servidores técnicos do Departamento de Reprodução animal pela contribuição e atenção. Especialmente ao Sr. Edson pela amizade durante todo período de pós-graduação.

Aos amigos e colegas pós-graduandos, Guilherme Fazan Rossi, Marina Oliveira, Marcelo Borges, Luana Gomes, Júlia Bevilaqua, Maria Amélia Pupin, Luana Lelis por toda ajuda na condução do experimento, no dia a dia no campo, por compartilhar comigo as dificuldades e as alegrias deste período experimental! Sem vocês não seria possível chegar até aqui! Muito obrigada!

A todos estagiários que passaram pelo Instituto de Zootecnia e contribuíram para a execução deste estudo. Obrigada pela ajuda durante os manejos e pelo convívio divertido.

A UNESP e ao Departamento de Reprodução Animal por tudo que me proporcionaram.

A todos que de alguma forma estiveram envolvidos neste projeto, auxiliando e tornando possível a concretização deste trabalho!

Muito obrigada!

“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	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Dinâmica folicular na pré-puberdade em novilhas	2
2.2. Peso a puberdade	5
2.3. Contagem de folículos antrais (CFA)	7
2.4. Ecogenicidade e ecotextura uterina.....	10
2.5. Morfometria Vulvar	11
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 – Artigo elaborado conforme as normas da revista <i>Animal Reproduction Science</i>	21
ABSTRACT	21
1. INTRODUCTION	22
2. Material and Methods	25
<i>Location, ethics, and research facility</i>	25
<i>Animals and experimental design</i>	26
<i>B-mode and color Doppler ultrasonographic assessments</i>	27
<i>Vulvar morphometry</i>	28
<i>Statistical analysis</i>	28
3. RESULTS	29
4. DISCUSSION	31
5. CONCLUSION	36
6. ACKNOWLEDGEMENTS	36
7. AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT	36
8. COMPETING INTERESTS STATEMENT	36
9. REFERENCES	37

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

CERTIFICADO

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	<i>Bos taurus</i> / <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i>
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.


Prof.ª Dr.ª 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

RELATIONSHIPS OF PREPUBERTAL SOMATIC DEVELOPMENT AND MORPHOLOGICAL/ULTRASONOGRAPHIC ATTRIBUTES OF THE REPRODUCTIVE ORGANS IN NELLORE HEIFERS WITH THE TIMING OF THE FIRST CALVING

RESUMO – A determinação de potenciais preditores de fertilidade em fêmeas bovinas pode favorecer a seleção de fêmeas mais férteis nos rebanhos. O presente estudo avaliou parâmetros reprodutivos como a contagem de folículos antrais (CFA), biometria ovariana e uterina, características ecotexturais do tecido uterino, área de vascularização do pedículo ovariano e morfometria vulvar, que poderiam prever se novilhas Nelore pré-púberes terão melhor eficiência reprodutiva nas estações reprodutivas subsequentes. Trinta e nove novilhas Nelore pré-púberes de $22,5 \pm 0,2$ meses de idade foram avaliadas quanto ao peso, escore corporal, morfometria vulvar, biometria uterina e ovariana, ecogenicidade uterina e parâmetros de ecotextura, contagem de folículos antrais (CFA) e diâmetro do folículo dominante em cinco diferentes fases aleatórias da onda folicular. Após a puberdade, as novilhas foram introduzidas em uma estação de monta natural e todas as variáveis avaliadas na pré-puberdade foram comparadas entre novilhas que pariram e aquelas que não pariram durante as duas primeiras estações de monta após a puberdade, bem como entre novilhas que pariram durante a primeira estação reprodutiva, durante a segunda estação reprodutiva e novilhas que não pariram em nenhuma estação reprodutiva. A análise estatística foi realizada usando variância unidirecional (ANOVA) e todos os procedimentos de comparação múltipla aos pares (método Holm-Sidak) para valores médios com efeitos principais significativos ou interações de efeitos principais. Todos os animais que pariram apresentaram maior peso corporal no início ($294,2 \pm 6,4$ kg) e no final do período de estudo ($284,9 \pm 6,0$ kg). Além disso, fêmeas que pariram na primeira estação reprodutiva apresentaram maior peso corporal ($304,8 \pm 5,9$ kg) em relação às fêmeas que não pariram em nenhum momento ($273,5 \pm 7,2$ kg). Ao comparar os parâmetros reprodutivos como potenciais preditores de fertilidade em novilhas que pariram ou não pariram, observamos que características como a contagem de folículos antrais (CFA) diferiu entre os grupos avaliados ($P=0,003$), de modo que as novilhas que pariram tiveram maior CFA quando comparadas às novilhas que não pariram. No entanto, quando a CFA foi observada nos grupos de novilhas que pariram na primeira estação, segunda estação ou que não pariram, notou-se que novilhas que pariram na primeira estação reprodutiva e novilhas que não pariram em nenhuma estação apresentaram menor CFA do que novilhas que pariram na segunda estação reprodutiva. O diâmetro ovariano foi maior ($P=0,03$) em novilhas que pariram em uma das duas estações. A área dos vasos sanguíneos do pedículo ovariano também diferiu entre os grupos de novilhas ($P=0,03$). Já a largura vulvar foi menor nas novilhas que não pariram em nenhuma estação reprodutiva ($P=0,005$), demonstrando que este pode ser um bom preditor para a seleção de fêmeas potencialmente mais férteis. As características de ecogenicidade e ecotextura uterina não diferiu entre grupos avaliados, mas foi diferente entre os dias de avaliação. Nossos resultados demonstram que as características avaliadas como possíveis preditores de fertilidade para a seleção de novilhas Nelore mais férteis ainda na vida pré-púbere da fêmea e no momento aleatório da onda folicular são influenciadas por fatores possivelmente relacionados ao momento da onda, necessitando de estudos

complementares para determinar de forma segura esses fatores influenciadores e prever com segurança a fertilidade dessas fêmeas nas estações reprodutivas subsequentes.

Palavras-chave: bovinos, contagem de folículos antrais, fertilidade, morfometria vulvar, preditores, ultrassonografia

RELATIONSHIPS OF PREPUBERTAL SOMATIC DEVELOPMENT AND MORPHOLOGICAL/ULTRASONOGRAPHIC ATTRIBUTES OF THE REPRODUCTIVE ORGANS IN NELLORE HEIFERS WITH THE TIMING OF THE FIRST CALVING

ABSTRACT – The determination of potential fertility predictors in bovine females may favor the selection of more fertile females in herds. The present study evaluated reproductive parameters that could predict whether prepubertal Nelore heifers will have better reproductive efficiency in subsequent breeding seasons. Thirty-nine prepubertal Nelore heifers were evaluated for weight, body condition score, vulvar morphometry, uterine and ovarian biometry, uterine echogenicity and echotexture parameters, antral follicle count (AFC) and dominant follicle diameter at 5 different random phases of the follicular wave. After puberty, heifers were introduced in a natural breeding season and all variables evaluated at prepuberty were compared between heifers that calved and those that did not calve during the first two breeding seasons after puberty, as well as between heifers that calved by first time during the first breeding season, during the second breeding season and heifers that did not calve in any breeding season. Statistical analysis was performed using one-way variance (ANOVA) and all pairwise multiple comparison procedures (Holm-Sidak method) for mean values with significant main effects or main effect interactions. All animals that calved had higher body weight ($P < 0.05$) at the beginning and end of the study period. In addition, females that calved in the first breeding season had higher body weight ($P < 0.05$) compared to females that did not calve at any time. When comparing reproductive parameters as potential predictors of fertility in heifers that calved or not calved, we observed that characteristics such as antral follicle count (AFC) differed between the evaluated groups ($P = 0.003$), so that heifers that calved had greater CFA when compared to heifers that did not calve. However, when CFA was observed in groups of heifers that calved in the first season, second season or that did not calve, it was observed that heifers that calved in the first breeding season and heifers that did not calve in any season had lower CFA than heifers that calved in the second breeding season. The ovarian diameter was higher ($P = 0.03$) in heifers that calved in one of the two seasons. A área dos vasos sanguíneos do pedículo ovariano também diferiu entre os grupos de novilhas ($P = 0.03$). Vulvar width was smaller in heifers that did not calve in any breeding season ($P = 0.005$), demonstrating that this may be a good predictor for the selection of potentially more fertile females. The characteristics of echogenicity and uterine echotexture did not differ between the evaluated groups but were different between the evaluation days. Our results demonstrate that the characteristics evaluated as possible predictors of fertility for the selection of more fertile Nelore heifers still in the prepubertal life of the female and at the random moment of the follicular wave are influenced by factors possibly related to the moment of the wave, requiring further studies to reliably determine these influencing factors and reliably predict the fertility of these females in subsequent breeding seasons.

Keywords: antral follicle count, cattle, fertility, predictors, ultrasound, vulvar morphometry

LISTA DE TABELAS

Página

Table 1. Mean (\pm SEM) age, weight, and body condition score (BSC) of Nellore heifers that subsequently calved or did not calve during the first two pubertal breeding seasons.....	46
Table 2. Mean (\pm SEM) age, weight, and body condition score (BSC) of Nellore heifers that subsequently did not calve or calved for the first time in the first or second pubertal breeding season.....	47

LISTA DE FIGURAS

Página

Figure 1. Main effect of the group of prepubertal heifers that calved or did not calve in subsequent breeding seasons, the effect of evaluation days, and interaction between effects for characteristics of antral follicle count (AFC), ovarian diameter, area of ovarian pedicle blood vessel area, vulva width, uterine echogenicity (NPV – numerical pixel values) and uterine echotexture (standard deviation of NPV).48

Figure 2. Main effect of the group of prepubertal heifers that calved in the first breeding season, second breeding season, or heifers that did not calve in the subsequent seasons, the effect of assessment days and interaction between effects for characteristics antral follicle count (AFC), ovarian diameter, area of ovarian pedicle blood vessel area, vulva width, uterine echogenicity (NPV – numeric pixel values) and uterine echotexture (NPV standard deviation).49

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro é considerado o segundo maior do mundo, e constituído principalmente de raças zebuínas, sendo a Nelore equivalente a 90%, e apesar desses animais serem considerados adaptados as condições climáticas tropicais, um fator de desvantagem é que são considerados sexualmente tardios (ARAÚJO, et al., 2018). Por este motivo, estudos que visem identificar e selecionar fêmeas sexualmente precoces e mais férteis dentro do rebanho brasileiro é altamente desejado por trazer grande retorno econômico para os sistemas pecuários brasileiro.

Fêmeas que tem o primeiro parto mais cedo terão em toda sua vida produtiva um maior número de bezerros nascidos, trazendo maior retorno financeiro ao produtor (ARAÚJO et al., 2018). Novilhas selecionadas pela idade ao primeiro parto podem contribuir para rebanhos com puberdade precoce, uma vez que podem produzir progênie com esta característica (MONTEIRO, 2011). Para isso, parâmetros de avaliação como peso e escore corporal, quando em conjunto com informações de parâmetros reprodutivos podem ser utilizados como preditores para o potencial reprodutivo da fêmea bovina.

A hipótese do presente estudo é de que características reprodutivas avaliadas de forma não invasiva como o peso corporal, escore de condição corporal (ECC), a contagem de folículos antrais (CFA), o diâmetro ovariano, a área de vascularização no pedículo ovariano, morfometria vulvar e ecogenicidade e ecotextura uterina podem prever a fertilidade nas estações de monta natural subsequentes de novilhas Nelore quando avaliadas durante a fase de pré-puberdade em momento aleatório da onda folicular. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar características reprodutivas não invasivas que possam prever se novilhas Nelore pré-púberes terão nas estações de monta subsequentes melhor eficiência reprodutiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica folicular na pré-puberdade em novilhas

A puberdade é o momento no qual o animal se torna capaz de reproduzir, sendo resultado de uma série de eventos que regulam o eixo reprodutivo endócrino, passando de um estado de inatividade ovariana para um estado de ovulações regulares (DOBSON; KAMONPATANA, 1986; KINDER; DAY; KITTOK, 1987; LANNA, 2004). A atividade ovariana envolve sinalização extraovariana e fatores intrafoliculares, os estágios iniciais da foliculogenese pode se dar na ausência de gonadotrofinas, no entanto, a partir do estágio de folículo antral (de 1 para 4mm de diâmetro) há dependência das gonadotrofinas, principalmente o hormônio folículo estimulante (FSH), já a partir da fase de seleção folicular a dependência passa a ser principalmente de hormônio luteinizante (LH). Além disso, há dependência dos fatores intrafoliculares, como fatores de crescimento local (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011).

O estímulo para ocorrência da puberdade se dá por uma cascata de eventos, a qual é regulada por mecanismos que controlam a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, induzindo aumento da liberação de LH pela hipófise (DAY; ANDERSON, 1998). O mecanismo neuroendócrino envolvido no evento de puberdade consiste em redução da sensibilidade do hipotálamo a esteroides sexuais durante período de pré-puberdade, devido a diminuição de receptores de estrógeno no hipotálamo, fator este que permite o aumento da secreção de gonadotrofinas, especialmente de LH como fator primário, estimulando assim o desenvolvimento folicular e a síntese de estrógeno (DAY et al., 1987). A elevação da concentração de estrógeno, além de induzir comportamento de estro, também induz um pico pré-ovulatório de LH, responsável por induzir a ovulação (DAY et al., 1987; SEMMELMANN; LOBATO; ROCHA, 2001).

Normalmente raças pertencentes a espécie *Bos taurus indicus* em média se tornam púberes, apresentando ciclicidade ovariana e desenvolvimento folicular com manifestação de estro aos 24 meses (ROMANO et al., 2007; WILLIAMS; AMSTALDEN, 2010). Isso porque os zebuínos passaram por menor pressão de seleção para características relacionadas a precocidade e fertilidade sexual quando comparados com animais taurinos (CHENOWETH, 1994).

Os folículos ovarianos são formados ainda durante a fase fetal, a crista gonadal é a primeira manifestação de desenvolvimento das gônadas nos mamíferos, formando um relevo na parte medial dos túbulos mesonéfricos (MACKAY, 2000). As células germinativas primordiais (CGP) surgem extragonadal, no saco vitelínico e migram via endoderma do intestino posterior até o mesentério, daí para as pregas mesonéfricas, até atingirem a crista gonadal, onde se proliferam de forma intensa entre 5 e 6 semanas, se tornam hiperplásicas e de aspecto ameboide, espalham-se entre o epitélio celômico e o mesênquima, no interior da gônada em formação as CGP iniciam a diferenciação em oogônias, dividindo-se por mitose (PETERS, 1970). O processo de mitose cessa entre 150 e 180 dias, quando a maioria dos oócitos atingem a fase de dictióteno, em paquíteno da prófase meiótica, e envolvidos nos folículos primordiais aos 170 dias (ERICKSON, 1966). Os folículos primordiais assim são denominados quando possuem uma única camada de células foliculares planas que circundam oócitos esféricos, constituindo assim a reserva ovariana (ERICKSON, 1966; BASSO; ESPER, 2002; LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

O ovário fetal apresenta folículos primordiais, primários e secundários aos 90 dias de gestação, aos 140 e aos 210, respectivamente (ARAÚJO et al., 2010). O folículo primário é formado quando o oócito está envolto por uma camada completa de 11 a 20 células da granulosa cuboide (HULSHOF et al., 1992). Já os folículos secundários possuem duas ou mais camadas de células da granulosa cuboide (BASSO; ESPER, 2002; LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011). Com o desenvolvimento e crescimentos dos folículos secundários, há uma organização das células da granulosa em várias camadas, e forma-se o antro, denominado assim por consistir em uma cavidade repleta de líquido (MARTINS et al., 2008; SARAIVA et al., 2010; LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011). E então os folículos passam a ser chamados de terciários e passam a ter desenvolvimento das camadas da teca interna e externa, lâmina basal e células do cumulus. Já os folículos pré-ovulatórios possuem diâmetro maior, bem como cavidade e são assim designados por estarem próximo a fase de ovulação (LEITÃO et al., 2009).

Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas (SIROIS; FORTUNE, 1988; FIGUEIREDO et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORI et al., 2010; SARTORI; BARROS,

2011). Os ciclos com uma e quatro ondas foliculares raramente são observados (SIROIS; FORTUNE, 1988). A onda folicular é caracterizada pelo crescimento de um determinado grupo de folículos antrais na fase denominada recrutamento, com posterior seleção (fase de seleção) de um folículo dominante (fase de dominância), e consequente regressão dos folículos subordinados e ovulação ou atresia do folículo ovulatório (ADAMS; EVANS; RAWLINGS, 1994; GINTHER et al., 1996; BARUSELLI et al., 1997; AERTS; BOLS, 2010).

O recrutamento e seleção de folículos dependem de alguns fatores. O aumento nos níveis de FSH permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular (ADAMS et al., 1992). A regressão do folículo dominante durante a onda folicular, causa um aumento dos níveis de FSH, com diminuição dos níveis de estradiol e inibina, com isso, esse FSH liberado pela hipófise, é responsável pelo recrutamento de um novo grupo de folículos antrais (AERTS; BOLS, 2010).

A dominância folicular por parte do maior folículo (folículo selecionado) faz com que ocorra a supressão dos folículos recrutados na mesma onda, e inibição do recrutamento de novos folículos, até que ocorra uma nova onda (BARUSELLI et al., 1997; AERTS; BOLS, 2010). Essa inibição ocorre através da supressão de FSH, na qual tem como responsáveis o estradiol, inibina-A e inibina-B (MELO, 2009). Ao que parece, todos os folículos pequenos em crescimento na onda, produzem a inibina, suprimindo o FSH durante os dois primeiros dias da onda emergente, posteriormente o estradiol secretado pelo folículo dominante torna-se o supressor mais importante do FSH (MELO, 2009; AERTS; BOLS, 2010). Na ocorrência da divergência folicular o folículo dominante passa a ter menor dependência de FSH e maior de LH, e por isso os folículos são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância (FORTUNE et al., 2001; MIHM et al., 2006; BURATINI Jr., 2007). De acordo com Aerts e Bols (2010) os folículos antrais de bovinos adquirem receptores de LH quando chega a 8 mm de diâmetro.

Anterior ao evento de puberdade o crescimento folicular tem início, mas o maior potencial de liberação de LH na qual vai permitir a ovulação é apenas quando a fêmea atinge a puberdade sexual (NASCIMENTO et al., 2003; RAWLINGS et al., 2003). Portanto, em novilhas pré-púberes, semelhante a vacas cíclicas, o recrutamento folicular é concebido por um aumento na liberação FSH, promovendo crescimento dos

folículos em padrão de ondas (EVANS; ADAMS; RAWLING, 1994) e conseqüentemente aumentando a capacidade de síntese de estradiol (ADAMS et al., 1992; BAO; GARVERICK et al., 1998). Porém, nesses animais que ainda não atingiram a puberdade o folículo dominante cresce e atinge seu diâmetro máximo durante a onda, no entanto, não ovula, sofre atresia, e com isso inicia-se uma nova onda folicular (LUCY et al., 1992). O que ocorre nesses animais na pré-puberdade é uma reduzida liberação de GnRH devido à ação do estradiol (E2) por exercer feedback negativo sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, não desencadeando a ovulação (DAY et al., 1987; MARSON; GUIMARÃES; MIRANDA NETO, 2004). O mecanismo de feedback positivo entre o estradiol e o hormônio luteinizante (LH), não é bem estabelecido em fêmeas pré-púberes, tornando o folículo dominante atrésico e emergindo uma nova onda folicular (BERGFELDT al., 1994; EVANS; ADAMS; RAWLING, 1994). O aumento na secreção de LH ocorre no início da pré-puberdade e outro aumento no momento de transição para a peripuberdade (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Culminando no aumento nas concentrações de E2 ao final da fase de crescimento do folículo dominante (EVANS; ADAMS; RAWLING, 1994). Em estudo anterior foi demonstrado que o momento de diâmetro máximo do folículo dominante, no qual ocorre aumento dos níveis de E2 em fêmeas pré-púberes da raça Gir ocorreu aos 22 meses e o diâmetro máximo foi de 9,4 mm (SILVA et al., 2005).

Portanto, a diferença entre fêmeas púberes e fêmeas na pré-puberdade se dá pelas características de ondas foliculares que culminam em ovulação do folículo selecionado nas fêmeas púberes, enquanto nos animais pré-púberes as ondas foliculares são anovulatórias. Possivelmente porque fêmeas pré-púberes não conseguem produzir concentrações suficientes de LH, enquanto animais que já passaram pela puberdade possuem essa competência (HOPPER et al., 1993; ADAMS; EVANS; RAWLINGS, 1994; EVANS; ADAMS; RAWLING, 1994).

2.2. Peso a puberdade

Inúmeros fatores influenciarão na fertilidade de fêmeas bovinas, como a raça, idade e peso a puberdade (LANNA, 2004). A idade à puberdade determinará a competência da fêmea em seu primeiro manejo reprodutivo, no entanto, o peso associado a deposição de gordura é o fator mais importante para a puberdade, uma

vez que novilhas entram em fase reprodutiva quando atingem 55 a 60% do peso corporal adulto (MARTIN et al,1992; FREETLY; KUEHN; CUNDIFF, 2011; MONTEIRO, 2011). O peso é mais importante para o evento de puberdade do que a idade da fêmea, já que novilhas com ganho médio diário baixo são mais velhas e ainda assim podem ter peso semelhante a novilhas mais novas que tiveram maior ganho médio diário no momento do evento de puberdade, de forma que o ganho diário maior faz com que ocorra antecipação da puberdade (HALL et al., 1995; QUINTANS et al., 2004), melhorando assim taxa de concepção e prenhez (BUSKIRK; FAULKNER; IRELAND, 1995). Em contrapartida, situações em que o ganho de peso dos animais é prejudicado, como a falta de forragem ou de suplementação alimentar podem atrasar o início da vida reprodutiva, porque a deficiência nutricional suprime a secreção de LH no hipotálamo, atrasando a primeira ovulação (RAWLINGS et al., 2003; COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010).

Ao que se sabe, alterações metabólicas dependentes do status nutricional e do nível de gordura corporal estão envolvidas com mecanismos de regulação da liberação pulsátil de LH. Entre esses mecanismos, os hormônios metabólicos como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-1), a insulina, a glicose, a leptina e o neuropeptídeo Y são os envolvidos com a nutrição da fêmea e o evento de puberdade (BARASH et al., 1996; DE SOUSA et al., 2018). Os níveis de IGF-1 se elevam na peripuberdade e tem a capacidade de acelerar a puberdade da fêmea, uma vez que é capaz de promover a elevação nas concentrações intrafoliculares de estradiol (YELICH et al., 1996).

Já a leptina, está relacionada a reservas corporais da fêmea e associada a puberdade, sua produção é regulada pela insulina e pelos glicocorticoides nos adipócitos, e sua ação ocorre promovendo aumento na produção de esteroides sexuais e também por meio de ação no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, informando sobre o estado nutricional e permitindo que os mecanismos reprodutivos deem sequência nos eventos quando em condições adequadas de reservas energéticas (BARASH et al., 1996; LENTS et al., 2005). A leptina é encontrada em áreas do cérebro e outros tecidos, incluindo os ovários (BOLAND; LONERGAN; O'CALLAGHAN, 2001). Tem ação neuroendócrina com efeito estimulatório sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, e sinalizador da condição nutricional para o eixo

reprodutivo (ZIEBA et al., 2004). Ela age no eixo hipotálamico-hipófisisário por meio de receptores e do neuropeptídeo Y, o qual é o mediador primário da ação da leptina no hipotálamo sobre a regulação do LH, com efeitos estimulatórios ou inibitórios, dependendo da condição corporal da fêmea. Apesar do neuropeptídeo Y mediar estimulando a liberação de LH em animais com dieta sem restrição, os efeitos são maiores durante estresse nutricional, com supressão da expressão dos receptores de leptina e elevação dos receptores de neuropeptídeo Y, o que resulta em supressão da liberação de LH (WILLIAMS et al., 2002). A leptina também estimula o aumento da produção de hormônio alfa melanócito estimulante (α -MSH) atuando na sensação de saciedade (WILLIAMS et al., 2002).

Portanto é de extrema importância que fêmeas pré-púberes atinjam peso mínimo para conceberem, o que pode ser alcançado durante a fase de recria, quando submetidas a manejo nutricional que permita maior ganho de peso (DAY et al., 1987; SILVA; DIAS; ALBUQUERQUE, 2005)

2.3. Contagem de folículos antrais (CFA)

A determinação do número de folículos ovarianos em fêmeas bovinas é realizada por meio da ultrassonografia e utilizado em estudos com o objetivo de mostrar que o crescimento folicular na espécie bovina ocorre em ondas (SAVIO et al 1988; SIROIS; FORTUNE 1988; EVANS; ADAMS; RAWLING, 1994).

A CFA inclui a contagem de todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro de ambos os ovários. Estudos anteriores demonstraram que o número de folículos nas ondas foliculares ovarianas são altamente variáveis entre indivíduos, porém, altamente repetíveis dentro do mesmo indivíduo (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; IRELAND et al., 2008; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; MOSSA et al., 2010). Pelo fato de ser uma característica de alta repetibilidade foi considerada confiável para seleção de fêmeas potencialmente mais eficientes no aspecto reprodutivo (BURNS et al., 2005).

No entanto, é necessário considerar a variação na população folicular entre indivíduos e os fatores que influenciam. A formação dos folículos durante a vida fetal, condições patológicas maternas, restrições alimentares da própria mãe e efeitos do genótipo podem influenciar a variabilidade na população folicular. Até mesmo raça da

fêmea avaliada interfere, já que fêmeas zebuínas e taurinas apresentam diferenças na população folicular (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; IRELAND et al 2010; MOSSA et al., 2010; SILVA-SANTOS et al 2011). Como demonstrado por Batista et al. (2014) fêmeas *Bos taurus indicus* apresentaram variação na CFA de 18 a 85 folículos, enquanto em *Bos taurus taurus* essa variação ficou entre 8 e 51 folículos antrais.

A formação dos folículos em bovinos ocorre durante a vida fetal, a população de oogônias em desenvolvimento atinge um número máximo estimado de 2,1 milhões, diminuindo rapidamente do meio para o final da vida fetal devido à apoptose, de forma que a população de folículos reduz ao nascimento para aproximadamente 130.000 com variação entre indivíduos (ERICKSON 1966; AERTS; BOLS 2010). Acredita-se que no momento do desenvolvimento ovariano dos fetos o ambiente materno afeta a proliferação de oogônias durante a gestação e conseqüentemente o número de folículos pós-natal. Vacas leiteiras que apresentaram infecções crônicas durante a gestação diminuíram a reserva ovariana e o desempenho reprodutivo da futura prole (IRELAND et al., 2010). Outro fator importante de ser destacado são os desafios nutricionais aos quais as mães são submetidas durante a gestação, que também afetam a população folicular dos fetos, uma vez que bezerras nascidas de mães com restrição nutricional tiveram CFA e concentrações circulantes de AMH menores em comparação com bezerras nascidas de mães que não passaram por desafio nutricional (MOSSA et al., 2010). Logo, o número de folículos antrais nos ovários reflete o tamanho da reserva ovariana (IRELAND et al., 2008), no entanto é demonstrado que a reserva ovariana é impactada negativamente pelo ambiente materno durante a gestação.

Portanto, é importante ponderar que há variação entre indivíduos na CFA, mas que tal característica reprodutiva parece refletir no processo de seleção de fêmeas reprodutivamente superiores, uma vez que a população folicular demonstra o potencial reprodutivo desses animais (IRELAND et al., 2007; SILVA-SANTOS et al., 2014). E por isso, um meio eficaz de avaliar e identificar animais reprodutivamente superiores de forma não invasiva seria realizando a CFA com auxílio da ultrassonografia (OLIVEIRA et al., 2002).

A CFA tem sido bem reportada em estudos que acerca da produção de embriões, seja *in vitro* ou *in vivo* (IRELAND et al., 2007; IRELAND et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014; Santos et al., 2016). A maior CFA foi relacionada de forma positiva com o sucesso da produção de embriões (TANEJA et al., 2000; IRELAND et al., 2008; IRELAND et al., 2007). Silva- Santos et al. (2014) observaram que a produção de embriões nas fêmeas com alta CFA na produção *in vivo* foi de $6,95 \pm 5,34$ vs. $1,9 \pm 2,13$, enquanto na produção *in vitro* foi $6,10 \pm 4,51$ vs. $0,55 \pm 0,83$ embriões; $P < 0,05$, quando comparado com fêmeas de baixa CFA. Estes autores constataram que apenas um exame ultrassonográfico para determinação da CFA, realizado ainda na fase pré-púbere pode ser utilizado como um preditor para a produção embrionária. Para programas de produção de embriões é inegável a importância da CFA e de comum utilização como ferramenta prévia para seleção de potenciais doadoras, de forma a selecionar as fêmeas que tenham alta CFA (MOROTTI et al., 2015).

Vacas com baixa CFA já foi observado e relacionado a menores concentrações de progesterona (30 a 50%) durante o ciclo estral quando comparado a fêmeas com alta CFA, como demonstrado por Jimenez-Krassel et al. (2009). Isso porque as fêmeas com baixa CFA possuem função reduzida do CL devido a alteração na capacidade de resposta das células luteínicas ao LH, ocorre redução na proteína de regulação aguda da esteroidogênese (STAR) no CL, a capacidade de resposta da granulosa e células luteais ao 25-hidroxicolesterol é menor, e há uma responsividade baixa das células da granulosa do folículo dominante no processo de luteinização (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

Porém, apesar de bem documentado em fêmeas taurinas que a baixa CFA está associada a características de baixa fertilidade, como menor número de embriões viáveis (IRELAND et al., 2007), menores concentrações circulantes de progesterona e AMH (IRELAND et al., 2011), reduzida espessura do endométrio (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009), menor índices de prenhez ao final da estação de monta (MOSSA et al., 2012), maior intervalo entre partos (MARTINEZ et al., 2016). Os estudos em zebuínos e em animais de cruzamento no Brasil não associou a baixa CFA a baixos resultados reprodutivos (MENDONÇA et al., 2013; RODRIGUES et al.,

2013; SANTOS et al., 2013; MOROTTI et al., 2014; MORAES, 2016; SANTOS et al., 2016).

Portanto, é possível observar que a CFA como ferramenta preditora de fertilidade em fêmeas bovinas ainda é um desafio devido a alta variabilidade de respostas nos estudos já existentes, provavelmente devido a grande diversidade de rebanho, manejos distintos, critérios de classificação da CFA ainda não padronizados

2.4.2.4 Ecogenicidade e ecotextura uterina

O tecido uterino é constituído de três camadas; a interna ou de revestimento chamada endométrio. A serosa, sendo a camada mais externa do útero. E por fim, o miométrio que a camada mais espessa de músculo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Conforme se aproxima o evento da puberdade, mudanças na morfologia uterina são necessárias, e isso acontece pela interação entre estrógeno e progesterona, para que produza um ambiente propício para o estabelecimento de uma possível implantação embrionária e futura gestação (BERGFELD et al., 1994).

Os padrões de ecogenicidade e ecotextura do útero podem sofrer alterações a depender da fase do ciclo estral, seja após o estro ou na fase lútea (SCHMAUDER et al., 2008; PIERSON; GINTHER, 1987). Como demonstrado por Pierson e Ginther (1988) durante a fase de diestro é possível observar uma ecogenicidade altamente uniforme, diferente das fases de proestro, estro e metaestro. No proestro, a ecogenicidade do útero é reduzida, com regiões anecoicas maiores resultado de edema uterino e fatores de fluido intrauterino esperados durante o estro (PIERSON; GINTHER, 1988; DESCÔTEAUX; COLLOTON; GNEMMI, 2010). No estro, o enovelamento é mínimo dos cornos uterinos, o aumento dos fluidos intrauterinos começa 3 a 4 dias antes do estro, e atinge o máximo, por volta do estro, declinando até o terceiro dia do ciclo estral, assim tornando a ecotextura mais variável (PIERSON; GINTHER, 1988; DESCÔTEAUX; COLLOTON; GNEMMI, 2010). Já no diestro o enovelamento dos cornos uterinos é máximo, sendo a ecotextura uterina relativamente uniforme (DESCÔTEAUX; COLLOTON; GNEMMI, 2010).

As mudanças relacionadas ao tecido uterino podem ser visualizadas por ultrassonografia modo B (PIERSON; GINTHER, 1987; SCHMAUDER et al., 2008). Ainda como ferramenta complementar para avaliação da ecogenicidade e ecotextura

uterina, a análise por meio de software computadorizado permite uma medida mais objetiva (HERZOG; KIOSSIS; BOLLWEIN, 2008; SCHMAUDER et al., 2008). O valor de pixel em uma imagem varia de 0 (preto, imagem anecoica) a 255 (branco, imagem hiperecoica) (TOM; PIERSON; ADAMS, 1998). Na avaliação de imagens do tecido uterino os valores numéricos dos pixels demonstram a ecogenicidade uterina, já o desvio padrão dos valores numéricos dos pixels expressam a ecotextura uterina (TOM; PIERSON; ADAMS, 1998; VRISMAN, et al., 2018).

2.5. Morfometria Vulvar

A vulva é a porção externa do trato reprodutivo da fêmea, parte final do trato do trato genital tubular (KHATON; SARDER; GOFUR, 2015; KÖNIG; LIEBICH, 2016). É constituída de grossos lábios vulvares, que se unem nos ângulos dorsal e ventral (KÖNIG; LIEBICH, 2016). A distância entre as bordas laterais da vulva a partir do ponto médio da rima vulvar, em um ângulo de 90° determina a largura vulvar (MACULAN et al., 2018). Já a medição da rima vulvar se dá pela fissura entre os grandes lábios vulvares, e seu comprimento é determinado pela distância entre as comissuras dorsais e ventrais, a rima vulvar possui de 7 a 10 centímetros de comprimento (OLBRYCH; SZARA, 2011; MACULAN et al., 2018).

De acordo com estudos anteriores, as medidas de genitália externa em fêmeas bovinas estão associadas a parâmetros de fertilidade, por possuir relação com a CFA e pelo fato de a medida da largura vulvar estar ligada a eficiência reprodutiva do animal (EBORN; CUSHMAN; ECHTERNKAMP, 2013; MESQUITA et al., 2016; MACULAN et al., 2018). Como demonstrado por Mesquita et al. (2016) fêmeas Tabapuã com maior largura de vulva e comprimento de rima em relação ao tamanho do corpo apresentam maior CFA.

Até mesmo a eficiência da produção de embriões em bovinos é beneficiada ao selecionar doadoras com base em indicadores como a CFA e a largura vulvar (VASCONCELOS et al., 2020). Por este motivo, estudos demonstram que características relacionadas a morfometria vulvar devem ser consideradas na hora de selecionar vacas para a produção de embriões *in vitro* (MESQUITA et al., 2016; MACULAN et al., 2018).

Todavia, parâmetros de avaliação de genitália externa devem ser cuidadosamente avaliados quando na escolha de sua utilização para seleção, pois é necessário considerar que fatores como a genética do animal, o período do ciclo reprodutivo, uma possível gestação e tamanho corporal da fêmea influenciarão nestas medidas (MACULAN et al., 2018).

3. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Reproduction**, v. 100, n. 1, p. 27-33, 1994.
- ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 180-187, 2010.
- ARAÚJO, A. C. R. et al. Indução à puberdade em novilhas. In: **ANAIS COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR (ISSN-2527-2500) & CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR**. 2018. Disponível em: < <https://www.unifimes.edu.br/ojs/index.php/coloquio/article/view/502>> Acesso em: 14/09/2022
- ARAÚJO, V. R. et al. Papel das proteínas morfogenéticas ósseas-6 e-7 (BMP-6 e-7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 69-78, 2010.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.
- BARASH, I. A. et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144-3147, 1996.
- BARUSELLI, P. S. et al. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531-1547, 1997.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 311-319, 2002.
- BATISTA, E. O. S. et al. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.
- BERGFELD, E. G. M. et al. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 5, p. 1051-1057, 1994.
- BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323-1340, 2001.

BURATINI JR, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 190-196, 2007.

BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

BUSKIRK, D. D.; FAULKNER, D. B.; IRELAND, F. A. Increased postweaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 937-946, 1995.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G. P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CHENOWETH, P. J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a review. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 12, p. 422-426, 1994.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 123-147, 2010.

DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. suppl_3, p. 1-15, 1998.

DAY, M. L. et al. 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**, v. 37, n. 5, p. 1054-1065, 1987.

DE SOUSA, R. T. et al. Fatores relacionados ao desenvolvimento reprodutivo em novilhas Nelore: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 172, 2018.

DESCÔTEAUX, L.; COLLOTON, J.; GNEMMI, G. (Ed.). **Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography**. John Wiley & Sons, 2009.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 1-36, 1986.

EBORN, D. R.; CUSHMAN, R. A.; ECHTERNKAMP, S. E. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 9, p. 4168-4179, 2013.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLING, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Reproduction**, v. 102, n. 2, p. 463-470, 1994.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 3-4, p. 200-211, 1995.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

FREETLY, H. C.; KUEHN, L. A.; CUNDIFF, L. V. Growth curves of crossbred cows sired by Hereford, Angus, Belgian Blue, Brahman, Boran, and Tuli bulls, and the fraction of mature body weight and height at puberty. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2373-2379, 2011.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

HAFEZ E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ed. São Paulo. Manole, 2004. p. 319-329.

HALL, J. B. et al. Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 73, n. 11, p. 3409-3420, 1995.

HERZOG, K.; KIOSSIS, E.; BOLLWEIN, H. Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques. **Animal reproduction science**, v. 106, n. 3-4, p. 289-297, 2008.

HOPPER, H. W. et al. Follicular development in prepubertal heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 31, n. 1-2, p. 7-12, 1993.

HULSHOF, S. C. J. et al. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. **Proceedings ICAR**, p. 336-338, 1992.

IRELAND, J. J. et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2010.

IRELAND, J. L. H. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.

IRELAND, J. J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, 2007.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1272-1281, 2009.

KHATON, R.; SARDER, M. J. U.; GOFUR, M. R. Biometrical studies of reproductive organs of dairy cows of different genotypes in Bangladesh. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, p. 388-395, 2015.

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOCK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 34, p. 167-186, 1987.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos-: Texto e Atlas Colorido**. Artmed Editora, 2016. 824 p.

LANNA, D. P. D. Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, **Anais**, v. 4, p. 41-78, 1997.

LEITÃO, C. C. F. et al. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.

LENTS, C. A. et al. Influence of nutrient intake and body fat on concentrations of insulin-like growth factor-I, insulin, thyroxine, and leptin in plasma of gestating beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 586-596, 2005.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 472-482, 2011.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. **International Review Cytology**, v. 200, p. 47-99, 2000.

MACULAN, R. et al. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal reproduction science**, v. 189, p. 84-92, 2018.

MARSON, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; MIRANDA NETO, T. Puberdade e maturidade sexual em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 3-12, 2004.

MARTIN, L. C. et al. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 4006-4017, 1992.

MARTINEZ, M. F. et al. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, v. 85, p. 466-475, 2016.

MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.36-49, 2008

MELO, C. L. **Dinâmica folicular de vacas de corte tratadas com três protocolos de sincronização da ovulação**. 2009. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MENDONÇA, H. G. R. et al. Pregnancy rates following FTAI of Nelore heifers (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 452, 2013.

MESQUITA, N. F. et al. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 6, p. 587-590, 2016.

MIHM, M. et al. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 6, p. 1051-1059, 2006.

MONTEIRO, F. M. **Puberdade em novilhas Nelore provenientes de duas linhas de seleção para peso**. 2011. 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MORAES, F. L. Z. et al. Influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas submetidas à IATF. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 311-313, 2016.

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

MOROTTI, F. et al. Follicular dynamics in Nelore females (*Bos indicus*) with high or low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 352, p. 713-720, 2014.

MOSSA, Fr. et al. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian. **Reproduction**, v. 140, p. 713-720, 2010.

MOSSA, F. et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 5, p. 2355-2361, 2012.

NASCIMENTO, A. A. et al. Morphometric correlation of the ovary of bovine females on different reproductive stages. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 126-132, 2003.

OLBRYCH, K.; SZARA, T. Morphology of external female reproductive organs in European bison (*Bison bonasus* L.). **European Bison Conservation Newsletter**, v. 4, p. 55-62, 2011.

OLIVEIRA, J. F. C. et al. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 1-2, p. 1-10, 2002.

OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, R. M.; MINGOTI, G. Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 418-432, 2011.

PETERS, H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 259, n. 828, p. 91-101, 1970.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 8, p. 995-1001, 1987.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21-37, 1988.

QUINTANS, G. et al. Effect of winter management on the onset of puberty in beef heifers under grazing conditions. In: **15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. 2004. Abstracts**. p.22, 2004.

RAWLINGS, N. C. et al. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 259-270, 2003.

RODRIGUES, A. S. et al. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 801-804, 2013.

ROMANO, M. A. et al. Follicular dynamics in heifers during pre-pubertal and pubertal period kept under two levels of dietary energy intake. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 6, p. 616-622, 2007.

SANTOS, G. M. G. et al. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 165, p. 17-21, 2016.

SANTOS, G. M. G. et al. Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 451, 2013.

Saraiva, M.V.A. et al. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.206-221, 2010.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, 2011.

SARTORI, R. et al. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reproduction Domestic Ruminant**, v. 67, p. 357-75, 2010.

SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SCHMAUDER, S. et al. 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**, v. 106, n. 1-2, p. 153-161, 2008.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 835-843, 2001.

SILVA, A. R. et al. Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Arquivo Latinoamericano de Produção Animal**, v. 13, n. 2, 2005.

SILVA, J. A. II; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1568-1572, 2005.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 119-125, 2014.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonograph. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

TANEJA, M. et al. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.

TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1345-1352, 1998.

VASCONCELOS, G. L. et al. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, *in vitro* embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 217, p. 106357, 2020.

VRISMAN, D. P. et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 106, p. 60-68, 2018.

WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M. Understanding postpartum anestrus and puberty in the beef female. **Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**, v. 28, p. 55-71, 2010.

WILLIAMS, G. L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 339-349, 2002.

YELICH, J. V. et al. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 325-338, 1996.

ZIEBA, D. A. et al. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 3, p. 804-812, 2004.

CAPÍTULO 2 – Artigo elaborado conforme as normas da revista *Animal Reproduction Science*

Relationships of prepubertal somatic development and morphological/ultrasonographic attributes of the reproductive organs in Nelore heifers with the timing of the first calving

Naiara Nantes Rodrigues^{1*}, Guilherme Fazan Rossi¹, Maria Amélia Ferrão Pupin¹, Luana Gomes Fernandes¹, Marina de Oliveira Silva², Marcelo Sant'Ana Borges², Júlia Ribeiro Bevilaqua¹, Joedson Dantas Gonçalves¹, Pawel M. Bartlewski³, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante², Fábio Morato Monteiro², Maria Emilia Franco Oliveira¹

¹Department of Pathology, Reproduction, and One Health, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, Via de acesso Prof. Paulo Donato

Castelane, s/n, Jaboticabal, SP, 14.884-900, Brazil

² Beef Cattle Research Center, Institute of Animal Science (IZ), Sertãozinho, SP, Brazil

³Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada

* **Corresponding author:** Maria Emilia Franco Oliveira, School of Agricultural and Veterinarian Studies (FCAV), São Paulo State University (UNESP), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: naiara_nantes@hotmail.com

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate reproductive parameters that can predict whether prepubertal Nelore heifers will have better reproductive efficiency in subsequent breeding seasons. Thirty-nine pre-pubertal Nelore heifers were examined to evaluate possible predictive parameters of fertility such as body weight, ovarian and

uterine biometry, AFC, uterine heterogeneity and cogenicity and vulvar morphometry. Subsequently, the heifers were placed in the breeding season for two consecutive years to relate the evaluated parameters and fertility. All animals that calved as well as females that calved in the first breeding season had higher body weight ($P<0.05$) at the beginning and end of the study period. When comparing reproductive parameters as potential predictors of fertility in heifers that calved or not, it was observed that heifers that calved had higher AFC when compared to heifers that did not calve ($P=0.003$). However, when AFC was observed in heifers that calved in the first season, second season or that did not calve, it was observed that females that calved in the first season and that did not calve had lower AFC than heifers that calved in the second breeding season. The mean ovarian diameter was higher in heifers that calved ($P=0.03$). The vulva width also differed between the evaluated groups and was smaller in heifers that did not calve in any breeding season ($P= 0.005$). Echogenicity and uterine echotexture showed differences only between the assessment days. Our results demonstrate that the characteristics evaluated as possible fertility predictors for the selection of more fertile Nelore heifers still in the prepubertal life of the female and at the random moment of the follicular wave are influenced by factors possibly related to the moment of the wave, requiring further studies. That isolate such factors to reliably predict the fertility of prepubertal females during subsequent breeding seasons.

Keywords: antral follicle count, fertility predictors, ultrasound, vulvar morphometry

1. INTRODUCTION

Brazilian cattle herds consist primarily of zebu breeds (*Bos indicus*) and, within these breeds, the Nelore genotype, which constitutes approximately 90% of all animals (Santos, 1999; ABIEC, 2018), and is best adapted to the country's climatic

conditions (Teixeira et al., 2006; De Sousa et al., 2018). The traditional reproductive management of Brazilian beef herds entails the natural breeding period (~ 90 days), during which cows and bulls (usually at a 25:1 ratio) are kept together (Campos et al., 2005). Heifers and cows that become pregnant at the beginning of the breeding period will give birth at the beginning of the calving season and then will have a longer recovery period before the next breeding period (Cushman et al., 2007; Cushman et al., 2013). To improve the reproductive efficiency of the herd is essential to select and retain the most productive females (Vaz and Lobato, 2010); therefore, early identification of prepubertal females with superior reproductive potential would also be highly beneficial. Determination of the markers of future fertility is, however, singularly challenging since pre- and peripubertal animals utilize nutritional energy intake for both somatic growth and establishing reproductive function (Bitencourt et al., 2020).

To predict future fertility and select animals that are more reproductively efficient, the non-invasive ultrasound evaluation of the reproductive organs is a very valuable tool (Honaramooz et al., 2004; Camargo and Barón, 2012). An array of reproductive features such as uterine morphometry (Mihura and Casaro, 1999; Gomez-León et al., 2019; Binelli et al., 2021) and ovarian activity (Sirois & Fortune, 1988; Knopf et al., 1989) can be determined ultrasonographically. In recent years, antral follicles count (AFC) has been the main focus of studies aiming to identify reliable predictors of mammalian female fertility (Morotti et al., 2015; McNeel and Cushman et al., 2015; Mossa et al., 2012; Ireland et al., 2008). Quantification of ovarian antral follicles ≥ 2 mm in diameter in ultrasonographically monitored heifers and cows revealed that AFCs exhibited tremendous variation in cattle despite their high repeatability in the same individual (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007).

Antral follicle counts in cattle have also been described as positively associated with several functional fertility measures (Ireland et al., 2008), such as pregnancy rate, duration of the inter-calving interval (Mossa et al., 2012), as well as oocyte yields, and embryo production after superovulatory treatments (Ireland et al., 2008). McNeel and Cushman (2015) found that for each additional day of the calving interval, there was a reduction in the number of antral follicles detected by ultrasound, and it was evident that heifers that calved later had lower AFC; these findings demonstrate that this reproductive characteristic is associated with duration calving interval in beef heifers. The number of antral follicles is also associated with parameters of animal development and growth, as well as precocious puberty manifestation in crossbred and taurine heifers (Morotti et al., 2017; Santa Cruz et al., 2018). Thus, females with lower AFC have reduced body weight, hip height, and loin eye area, in addition to slower growth that leads to later puberty (Patterson et al., 1992; Santa Cruz et al., 2018). However, some studies contradict this theory, since they have not identified a positive relationship between AFC and puberty in cattle (Cushman et al., 2014; Cunha et al., 2020). Although the fact that taurine heifers are heavier and have better body condition at the same time that they have a high AFC was observed, this characteristic was negatively associated with the development of the reproductive tract (Cunha et al., 2020). For this reason, further studies are needed to prove the relationship between puberty and AFC in heifers.

The AFC has been directly related to morphometric indices such as uterine (Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; McNeel et al., 2017; Morotti et al., 2018) and vulvar dimensions (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018). However, there is a paucity of information linking AFC and uterine/genital morphometrics with

fertility in young cattle. It was also proposed that various functional changes in the reproductive tracts of prepubertal females can be predicted from the results of computer-assisted analyses of ovarian and/or uterine ultrasonograms, by determining their first-order echotextural characteristics (i.e., pixel intensity and heterogeneity; Chandolia et al., 1997). A repeatable predictive model utilizing quantitative relationships among these metrics and the reproductive potential of *Bos indicus* cattle is urgently needed (Morotti et al., 2015).

The present study was carried out to evaluate whether non-invasively recorded somatic and reproductive parameters including body mass and animals' condition scores, vulvar morphometry, uterine biometry, echogenicity and echotexture, ovarian biometry, and AFC in prepubertal Nellore heifers are indicative of their reproductive performance in subsequent breeding seasons. Determination of fertility predictors in prepubertal bovine females will allow for the early selection of more fertile heifers and cows in the herd.

2. Material and Methods

Location, ethics, and research facility

The present study was conducted in southeastern Brazil, at the Beef Cattle Research Center, Institute of Animal Science in Sertãozinho, SP, Brazil (21°10'S and 48°5'W). This project was approved by the Ethics Committee of the School of Agricultural and Veterinarian Sciences of the São Paulo State University (protocol number 15.953/18). Systematic evaluation of reproductive parameters was carried out in September 2018, while ultrasound examinations for pregnancy diagnosis in the two subsequent seasons took place in March and April of 2019 and 2020, respectively. The animals were managed in a rotational paddock system, based on forage

availability, with the pasture being composed mainly of *Brachiaria* grasses, and had free access to clean water and mineral supplements.

Animals and experimental design

Thirty-nine prepubertal Nellore heifers (22.5 ± 0.2 mo of age) were examined by B-mode ultrasound to confirm the condition of prepubertal anestrus (i.e., absence of corpora lutea), in September 2018. Assessments started on a random day of ovarian follicular activity, considered as Day 0, and the assessment intervals were approximately 5 days (Days 0, 5, 9, 14, and 19) to assess reproductive parameters (vulvar morphometry, uterine biometry, echotextural characteristics, ovarian biometry, and AFC). The mean age of heifers at the beginning of the observation period was 22.5 ± 0.1 months and on the last day of examinations, it was 23.2 ± 0.1 months.

All females studied had two natural breeding seasons, from November 2018 to February 2019 and from November 2019 to February 2020, respectively. During breeding seasons, the heifers remained in paddocks in the presence of bulls with confirmed fertility, at the rate of 1 bull to 25 females. Nellore bulls used (aged over 22 months and with body condition scores between 3 and 4, on a scale of 1 to 5) were submitted to andrological evaluation 30 days before the breeding season began. Approximately 40 days after the end of each reproductive period, heifers/cows were submitted to pregnancy diagnosis by ultrasound examination using a Mindray Z5® device (Shenzhen, China) connected to a 7.5 MHz linear transrectal transducer; the positive pregnancy diagnosis was confirmed by visualization of the embryo and extraembryonic membranes.

B-mode and color Doppler ultrasonographic assessments

Transrectal ultrasound assessments were performed at five random times, on Days 0, 5, 9, 14, and 19 in all prepubertal heifers studied. The ultrasound examinations were performed with the Mindray Z5® (Shenzhen, China) connected to a linear transrectal transducer (at a frequency of 7.5 MHz). The evaluations were performed by a single trained technician, and the heifers were contained in an appropriate squeezer and kept in a quadrupedal position during the examinations.

Ultrasound examinations of the uterine horns were performed to determine the thickness and echotextural characteristics of the uterine wall. Uterine thickness (cm) was measured on a slice made with the transducer in the middle third of the right uterine horn and was defined as the distance from one edge to the other of the uterine wall using 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). Through this analysis, the numerical values of the pixels (uterine pixel intensity; echogenicity) and the standard deviation of the numerical values of the pixels (uterine pixel heterogeneity; echotexture) were obtained.

For the ovarian biometry, the measurements were taken of mean diameter (mm) (an average of vertical and horizontal dimensions of the ovaries at their largest cross-sectional area) with Image J® software (National Institute of Health, NIH, USA). To determine the AFC, all detectable antral follicles (≥ 2 mm of diameter) were quantified by mapping their position as previously described by Ireland et al. (2008). The

dominant follicle (DF) was defined as the follicle ≥ 6.2 mm (mean of the vertical and horizontal diameters recorded from its largest cross-section; Gimenes et al., 2008).

The vascularization of the ovarian pedicle was evaluated with the aid of a color Doppler ultrasound. Analyzes were performed on both ovaries and measurements were performed on images in which there was sufficient blood flow to measure three distinct areas of the blood vessel, totaling six areas per animal. After measuring the areas, the averages of the three blood vessel areas of each ovary were calculated to obtain the blood vessel area (mm) present in the ovarian pedicles at each time of observation. The standardized settings of the ultrasound equipment were as follows: B-mode (depth: 6.5 cm; main gain: 98%; frame rate: 55 frames/sec; and dynamic range: 45 dB) and Doppler mode (frequency: 7.5 MHz; main gain: 56%; color wall filter: 277; and pulse repetition frequency: 1.7 kHz).

Vulvar morphometry

Vulvar measurements were performed with a pachymeter to obtain the rima height and vulva width. The rima height (mm) was obtained from the distance between the dorsal and ventral commissures and the measurement of the vulva width (mm) was taken from one lateral edge of the vulvar labia majora to the other, at the midpoint of the rima height at a 90° angle, as described by Maculan et al (2018).

Statistical analysis

All single time-point variables were compared between all heifers that calved (n=23) and those that did not calve (n=16) during the first two pubertal breeding seasons as well as between the heifers that calved for the first time during the first season (1st season calving; n=13), during the second season (2nd season calving;

n=10), and those that did not calve (no calving; n=16) by one-way analysis of variance (ANOVA). Subsequently, all pairwise multiple comparison procedures (Holm-Sidak method) for mean values with significant main effects or interactions of the main effects were completed (SigmaPlot® statistical package; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Similarly, the differences before all the subsets of heifers for variables determined over five examination days were assessed by two-way ANOVA (main effects of breeding outcome and examination day: Days 0, 5, 9, 14, and 19). All values are expressed as the mean standard error of the mean (SEM) and a P value < 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

During the time points evaluated, no ovulation or corpora lutea were observed in the heifers studied, however, 74.3% of prepubertal females (22.5 ± 0.2 mo of age; mean \pm SEM) had large antral follicles classified as DF on all evaluation days. On Day 0, only two heifers did not have a DF; on Day 5, three females did not have DF; on Day 9 and Day 14 of evaluation, five and four heifers did not have DF, respectively; and on Day 19, eight heifers had only small follicles.

Regarding the age, weight, and body condition score (BCS) recorded in Nellore heifers of the present study, all animals that calved had a greater ($P < 0.05$) body weight, at the beginning and the end of the study period, compared with those that did not calve; however, there was no significant difference for BCS between groups of heifers that calved or did not calve later (Table 1). In addition, prepubescent females that calved in the first calving season had higher body weight ($P < 0.05$) both at the beginning and end of the observation period compared to females that did not calve (Table 2).

The reproductive parameters that presented significant main effects of time of observation/group (females that had positive pregnancy and those that had negative pregnancy) are shown in Figure 1. The AFC of the right and left ovaries, and total were greater ($P<0.05$) in females that calved compared with those that did not calve. Left ovary diameter and mean ovary diameter were higher ($P<0.05$) in females that calved compared to those that did not calve. The left ovary diameter also differs ($P<0.05$) among days (on Day 0 was greater than on Day 14). The average ovarian pedicle blood vessel area was greater ($P<0.05$) in females that did not calve compared with those that calved, as well as it was greater ($P<0.05$) on Day 0 than on Days 9 and 14. The left ovarian pedicle blood vessel area differs ($P<0.05$) among days. The vulva width was greater ($P<0.05$) in females that calved compared with those that did not calve, while the intensity and heterogeneity of uterine pixels differed only between evaluation days ($P<0.05$).

The reproductive parameters that presented significant main effects of time of observation/group (females that calved in the first or second calving season or that did not calve) are shown in Figure 2. The AFC of the right and left ovaries, and total were greater ($P<0.05$) in females that calved in the second season calving compared with both other groups. The left ovarian diameter was smaller ($P<0.05$) in females that did not calve compared with both other groups, as well as it was shown a difference ($P<0.05$) among days. The left and average ovarian pedicle blood vessel areas differ ($P<0.05$) over days. The vulva width was greater ($P<0.05$) in females that calved in the first season calving compared with females that did not calve on Day 19. The intensity and heterogeneity of uterine pixels differ ($P<0.05$) among days.

There were no main effects of time of observation/group for the diameter of the dominant follicle (9.0 ± 0.1 mm), rima height (84.2 ± 0.6), right ovary diameter (17.3 ± 0.1 mm), right ovarian pedicle blood vessels area (1.5 ± 0.1 mm) and uterine thickness (0.8 ± 0.0 cm).

4. DISCUSSION

The present study evaluated potential predictors of reproductive performance in prepubertal Nellore females to favor the selection of heifers with greater fertility potential before the beginning of their reproductive life. Among the first findings, the strong relationship between weight and reproductive performance was confirmed (Wettemann et al., 2003). Body weight reflects the animal's energy reserves and body fat can modulate the release of reproductive hormones, such as LH (Schillo et al., 1982), directly influencing puberty (Patterson et al., 1992) and, consequently, the cyclicity of the female. Richards et al. (1989) demonstrated that when cows were subjected to a weight loss of 1% of body weight per week, luteal activity was absent after 26 weeks of weight loss, due to the reduced frequency of LH pulses. Another factor involved in the relationship between weight and reproductive activity is the concentration of leptin since the increase in body reserves provides an increase in the levels of leptin secreted by adipocytes, promoting, in turn, early puberty of heifers and reproductive success (Garcia et al., 2002; Lents et al., 2005). The modulation of reproductive activity is also influenced by the concentration of IGF-1, a metabolic signal that reinforces the action of estrogen, stimulating the release of GnRH and consequently of LH (Yelich et al., 1996; Garcia et al., 2002; Hashizume et al., 2002). Thus, the selection of prepubertal Nellore heifers with higher weights can be a good indicator of better performance at the beginning of their reproductive life.

The determination of the follicular population present in bovine females can be of great importance to predict the reproductive performance of these animals (Burns et al., 2005; Morotti et al., 2015). In this sense, AFC has been the focus of many studies with the great promise of relating this count to female fertility, especially because it is non-invasively determined, has high variability between individuals, and has high repeatability within the same individual (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Ireland et al., 2008; Mossa et al., 2010). Such stability in the number of follicles in the same animal can be a good resource for the selection of females according to the AFC classification (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008; Morotti, 2015). In the present study, the AFC also remained constant between the five days of evaluation and was higher in females that calved in one of the subsequent calving seasons compared to those that did not calve.

Jimenez-Krassel et al. (2009) reported that Holstein cows with low AFC present endometrium with reduced thickness, as well as a lower circulating concentration of progesterone during diestrus. Other studies have also shown that Angus heifers with a larger AFC, in addition to having a higher uterine size and weight, produce and secrete a higher concentration of uterine protein, providing an even more appropriate environment for embryonic development (McNeel et al., 2017). In the present study, however, the uterine thickness did not differ between the groups of females that calved and those that did not. We believe that the absence of this relationship is possibly due to the time when the endometrial thickness measurement was performed (Souza et al., 2011) since the evaluations were conducted at random moments of the follicular wave and this may vary due to hormonal changes signaled between ovaries and uterus (Baerwald and Pierson, 2004).

When comparing the efficiency between the two calving seasons, a strangely higher AFC was seen in females that calved in the second calving season compared to those that calved in the first or did not calve in any of the calving seasons. Once again, studies have shown contradictions in stating whether the relationship between AFC and reproductive efficiency is direct or indirect in cattle. Most of the works confront the AFC against the performance in the biotechniques of assisted reproduction, as reviewed by Morotti et al. (2017), while in the present study, reproductive performance was evaluated under the management of a natural breeding season (i.e., without the use of hormonal protocols for synchronization and control of the follicular wave or controlled mating strategies). Additionally, the indication of AFC as a predictor of fertility is already well established in *Bos taurus taurus* regardless of the reproductive biotechnology used, but it has still been controversial in *Bos taurus indicus* (Ireland et al., 2011; Silva-Santos et al., 2011; Morotti et al., 2017).

When the analysis was performed isolating only the observation day, the AFC did not differ similarly between the reproductive performance groups for the five observation days, which shows that factors intrinsic to the animals, possibly related to ovarian dynamics, influence the relationship between AFC and reproductive performance. Since we evaluated heifers of the same breed and age, kept under the same environmental and nutritional conditions, without ovarian control strategies, we excluded possible causes that could interfere with follicular counts between the evaluation days. For this reason, we hypothesized that the stage of the follicular wave may have had an effect on our findings and influenced the way AFC varied between the groups and days evaluated, reinforcing the doubt about the relationship between AFC and fertility in zebu females in unknown phases of the wave.

Ovarian biometry was higher in females that later calved. However, when comparing females that calved in the first or second season and females that did not calve, differences were observed for these groups only in the diameter of the left ovary. It is possible to say that the differences in diameters at the time of sexual development in heifers reflect the development of the ovarian stroma, as well as an increase in the number and size of follicles during the development of follicular waves (Honaramooz et al., 2004). As the females were on random days of the follicular wave, the presence of dominant follicles in some of the females may have interfered with the ovarian diameter. Just as a greater ovarian cortical mass is required to support the growth of a large number of follicles (Cushman et al., 2009), we believe that both the presence and the size of the dominant follicle determine the ovarian biometric variables. This same reasoning can be used to explain the differences in the mean area of the ovarian pedicle. The arterial branch that supplies the dominant or pre-ovulatory follicle is expected to increase along the ovarian pedicle, so females with more advanced follicular waves are likely to have larger pedicle areas. However, establishing that this increase is correlated with the presence of a preovulatory follicle was not possible. More specific assessments are needed to establish this relationship.

Studies indicate that the morphometry of the external genitalia is associated with the fertility characteristics of bovine females, as well as directly associated with CFA (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2018). Our results demonstrate that vulvar width was greater in heifers that calved in subsequent seasons, demonstrating that this is a possible fertility predictor for the early selection of potentially more fertile females. As well as, Vasconcelos et al. (2020) demonstrated that vulvar width improves efficiency in the production of bovine embryos, being an important fertility indicator for

the selection of donor bovine females, Maculan et al. (2018) also observed in heifers, primiparous cows, and Tabapuã multiparous cows that vulvar measurements indicate association with fertility characteristics. In addition, there is a relationship between the width of the vulva and body size, suggesting that characteristics of the external genitalia are indicative of weight gain (Morotti et al., 2015). In our study, body weight showed to be a good predictor of fertility, as also observed by Mesquita et al. (2016) that body size is a good predictor of ovarian follicular reserve in cattle.

The results of echogenicity and echotexture of the uterine tissue in the present study did not show differences between the groups but between the evaluation days. Honaramooz et al. (2004) evaluated the development of the reproductive tract in prepubertal Hereford heifers and revealed a strong correlation between the development of reproductive tract segments with the pattern of change in the maximum diameter of the ovarian follicle and the heterogeneity of uterine pixels increasing transiently. In the present study, it was possible to observe that throughout the evaluations there was a decrease in uterine echogenicity, as well as in uterine heterogeneity when observing the group of females that calved in the first, second season, or did not calve. We believe that the females evaluated were possibly at a stage of follicular wave development with increased vascularization and/or secretory activity, resulting in increased fluid in the reproductive tract, causing a decrease in pixel intensity in the uterine tissue (Pierson and Ginther, 1988; DesCôteaux et al., 2010). Also, during the most estrogenic phase of the cycle, fluid is deposited in the endometrial tissue spaces which, being hypoechogenic in relation to other tissues, reduces overall uterine echogenicity (Schmauder et al., 2008), which was also verified

in our findings of lower echogenicity according to the evaluation days between the groups.

5. CONCLUSION

In conclusion, body weight can be used as a fertility predictor in prepubertal Nellore heifers, while the AFC parameter was inconclusive as a reliable predictor in prepubertal Nellore heifers in the present study. Pre-pubertal Nellore heifers, when evaluated at a random moment of the follicular wave were influenced by some factor not yet well determined that may have interfered in the result.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

“The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001”.

7. AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

NNR conceived, performed the experiments and laboratory analyses, analyzed the data, and prepared the draft manuscript.

GFR, MAFP, LGF, MOS, MSB carried out the experiments and analyses.

FMM conceived, and supervised animal experiments.

PMW, MEFO, JDG conceived, participated in the statistical analysis, revision, and writing of the manuscript.

MEZM participated in the statistical analyses.

All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version.

8. COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

9. REFERENCES

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, 2018. Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2018.

Baerwald A.R., Pierson R.A., 2004. Endometrial development in association with ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 24, 453-60. <https://doi.org/10.1002/uog.1123>

Binelli, M., Martins, T., Rocha, C.C., Silva, F.A.C.C., Bittar, J., Moriel, P., Gonella-Diaza, A., Butler, L., Sanders, C., 2021. Reproductive Tract Score: A Tool for Evaluating Beef Heifer Reproductive Potential. *IFAS Extension*, AN370. <https://doi.org/10.32473/edis-AN370-2021>.

Bitencourt, M.F., Cerdotes, L., Restle, J., Costa, P.T., Fernandes, T.A., Ferreira, O.G., Vaz, R.Z., 2020. Age and calving time affects production efficiency of beef cows and their calves. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 92. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181058>.

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. *Biol. Reprod.*, 73, 54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>

Camargo, E. S. C., Barón, E. M. P., 2012. Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión. *Cienc Agron*, 9, 2, 29-37.

Campos, W. E., Saueressig, M. G., Saturnino, H. M., de Souza, B. M., Amaral, T. B., Ferreira, F., 2005. Manejo reprodutivo em gado de corte. Cerrados, EMBRAPA – Doc. 134.

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](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00194-5).

Cunha F., Cushman R.A, Cruz RS., Nava G, Viñoles C., 2020. Antral follicular count has limited impact in the selection of more fertile beef heifers. *Livest. Sci.* 241, 104230. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104230>

Cushman R.A., McNeel A.K., Freetly H.C., 2014. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. *Livest. Sci.*, 162, 252-258. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.01.033>

Cushman, R.A., Allan, M.F., Thallman, R.M., Cundiff, L.V., 2007. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Influence of postpartum interval and estrous cycle length on fertility. *Anim. Sci. J.*, 85, 2156-2162. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0136>.

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. *Anim. Sci. J.*, 87, 1971–1980. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1728>.

Cushman, R.A., Kill, L.K., Funston, R.N., Mousel, E.M., Perry G.A., 2013. Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. *Anim. Sci. J.*, 91, 4486 - 4491. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6465>.

De Sousa, R. T., de Lima Gonçalves, J., dos Santos, S. F., Fernandes, A. M. F., Ricci, G. D., 2018. Fatores relacionados ao desenvolvimento reprodutivo em novilhas Nelore: Revisão. Pubvet, 12, 172. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n5a82.1-10>.

DesCôteaux, L., Gnemmi, G., Colloton, J., 2010. Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography. John Wiley & Sons. Inc., New York.

Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D. H., Williams, G. L., 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. J. Anim. Sci., 80, 8 2158-2167. <https://doi.org/10.1093/ansci/80.8.2158>.

Gimenes, L.U., Sá Filho, M.F., Carvalho, N.A.T., Torres-Júnior, 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>.

Gomez-León, V.E., Ginther, O.J., Araujo, E.R., Guimarães, J.D., Wiltbank, M.C., 2019. Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics I: Comparison of follicle growth profiles under different physiological conditions in heifers. Theriogenology, 123, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.006>

Hashizume, T., Kumahara, A., Fujino, M., Okada, K., 2002. Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. Anim. Reprod. Sci., 70, 13-21. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00190-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00190-7).

Honaramooz, A., Aravindakshan, J., Chandolia, R.K., Beard, A.P., Bartlewski, P.M., Pierson, R.A., Rawlings, N.C., 2004. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal

development of the reproductive tract in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 80, 15–29.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00136-2)

Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger ,J.K, Ireland, J.L.H, Mossa F, Lonergan P, Evans A.C.O. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 23, 1-14.

<https://doi.org/10.1071/RD10226>

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. *Hum. Reprod.* 22, 1687–1695.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>

Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 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. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093>.

Knopf, L., Kastehc, J.P., Schallenberger, E., 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6, 111-119. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(89\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0739-7240(89)90040-4).

Lents, C.A., Wettemann, R.P., White, F.J., Rubio, I., Ciccioli, N.H., Spicer, L. J., Payton, M.E., 2005. Influence of nutrient intake and body fat on concentrations of insulin-like growth factor-I, insulin, thyroxine, and leptin in plasma of gestating beef cows. *J. Anim. Sci.* 83, 586-596. <https://doi.org/10.2527/2005.833586x>.

Maculan, R., Pinto, T.L.C., Moreira, G.M., Vasconcelos, G.L. de, Sanches, J.A., Rosa, R.G., Bonfim, R.R., Gonçalves, T. de M., Souza, J.C. de, 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Anim. Reprod. Sci.* 189, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.011>

McNeel, A.K., Cushman, R.A., 2015. Influence of puberty and antral follicle count on calving day in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 84, 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.010>

McNeel, A.K., Soares, É.M., Patterson, A.L., Vallet, J.L., Wright, E.C., Larimore, E.L., Amundson, O.L., Miles, J.R., Chase, C.C., Lents, C.A., Wood, J.R., Cupp, A.S., Perry, G.A., Cushman, R.A., 2017. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.004>

Mesquita, N.F., Maculan, R., França, L., Maciel, S., Alves, N., Rodrigues, R., Carvalho, D.E., Moreira, G.M., Camisão, J., Souza, D.E., 2016. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. *J. Reprod. Dev.* 62, 587-590. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-059>

Mihura, H., Casaro, G., 1999. Selección de vaquillonas de reposición en rodeos de cría. *Taurus*, 1, 34-39.

Morotti, F., Moretti, R., dos Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Ramos Cerqueira, P.H., Seneda, M.M., 2018. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 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., 2017. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. In: *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., 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.

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Janet, L.H., Evans, A.C.O., 2010. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian. *Reprod.* 140, 713-720. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0214>

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 ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>

Patterson, D. J; Perry, R. C; Kiracofe, G. H; Bellows, R. A; Staigmiller, R. B; Corah, L. R., 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci.* 70, p. 4018–35. <https://doi.org/10.2527/1992.70124018x>

Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29, 21 – 37. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90029-5)

Richards, M.W., Wettemann, R.P., Schoenemann, H.M., 1989. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *J. Anim. Sci.* 67, 1520-1526. <https://doi.org/10.2527/jas1989.6761520x>

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>

Santos, R., 1999. Os cruzamentos na Pecuária Tropical. *Agropecuária Tropical*, Uberada.

Schillo, K.K., Dierschke, D.J., Hauser, E.R., 1982. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: increased threshold to negative feedback action of estradiol. *J. Anim. Sci.*, 54, 325 – 336. <https://doi.org/10.2527/jas1982.542325x>

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. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 153 – 161. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.022>

Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Hertel, M.F., Andrade, E.R., Rubin, M.I.B., Sturion, L., Melo-Sterza, F.A., Seneda, M.M., 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76, 1051-1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

Sirois, J., Fortune², J.E., 1988. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39, 308 – 317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.2.308>

Souza, A.H., Silva, E.P.B., Cunha, A.P., Gümen, 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>

Teixeira R.D.A., Albuquerque., L.G.D, Alencar., M.M.D., Dias, L.T., 2006. Interação genótipo-ambiente em cruzamentos de bovinos de corte. *R. Bras. Zootec.* 35, 1677-1683. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000600014>

Vasconcelos G.L., Cunha E.V., Maculan R., Viafara J.A.S., Silva A.W.B., Batista A.L.S., Silva J.R.V., Souza J.C., 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. *Anim. Reprod. Sci.* 217, 106357. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106357>

Vaz, R.Z., Lobato, J.F.P., 2010. Efeito da idade de desmame no desempenho reprodutivo de novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de idade. *R. Bras. Zootec.* 39, 142-150. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000100019>

Wettemann, R.P., Lents, C.A., Coccioli, N.H., White, F.J., Rubio, I., 2003. Nutritional and suckling-mediate anovulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, E48-E59. https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E48x

Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in

heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 13, 325-338.

[https://doi.org/10.1016/0739-7240\(96\)00046-X](https://doi.org/10.1016/0739-7240(96)00046-X)

Table 1. Mean (\pm SEM) age, weight, and body condition score (BSC) of Nellore heifers that subsequently calved or did not calve during the first two pubertal breeding seasons.

Variables	Cows that calved (n=23)	Cows that did not calve (n=16)
Age at first USG examination (months)	22.7 \pm 0.2	22.3 \pm 0.2
Age at calving (months)	41.9 \pm 2.3	-
Weight at the beginning of the observation period (kg)	294.2 \pm 6.4 ^a	273.5 \pm 7.2 ^b
Weight at the end of the observation period (kg)	284.9 \pm 6.0 ^a	263.9 \pm 6.0 ^b
BCS at the beginning of the observation period (1-5)	3.4 \pm 0.1	3.0 \pm 0.2
BCS at the end of the observation period (1-5)	3.4 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1
BCS at the end of the observation period (1-5)	3.4 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1

Within rows, mean values followed by different superscripts (^{ab}) are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Mean (\pm SEM) age, weight, and body condition score (BSC) of Nellore heifers that subsequently did not calve or calved for the first time in the first or second pubertal breeding season.

Variables	Cows that calved for the first time in the first breeding season (n=13)	Cows that calved for the first time in the second breeding season (n=10)	Cows that did not calve (n=16)
Age at first USG examination (months)	22.7 \pm 0.2	22.6 \pm 0.2	22.3 \pm 0.2
Age at calving (months)	37.5 \pm 0.2 ^a	48.1 \pm 0.3 ^b	-
Weight at the beginning of the observation period (kg)	304.8 \pm 5.9 ^a	280.4 \pm 12.4 ^{ab}	273.5 \pm 7.2 ^b
Weight at the end of the observation period (kg)	290.6 \pm 8.5 ^a	277.0 \pm 7.8 ^{ab}	263.9 \pm 6.0 ^b
BCS at the beginning of the observation period (1-5)	3.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2
BCS at the end of the observation period (1-5)	3.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1

Within rows, mean values followed by different superscripts (^{ab}) are significantly different (P<0.05).

Figure 1. Main effect of the group of prepubertal heifers that calved or did not calve in subsequent breeding seasons, the effect of evaluation days, and interaction between effects for characteristics of antral follicle count (AFC), ovarian diameter, area of ovarian pedicle blood vessel area, vulva width, uterine echogenicity (NPV – numerical pixel values) and uterine echotexture (standard deviation of NPV).

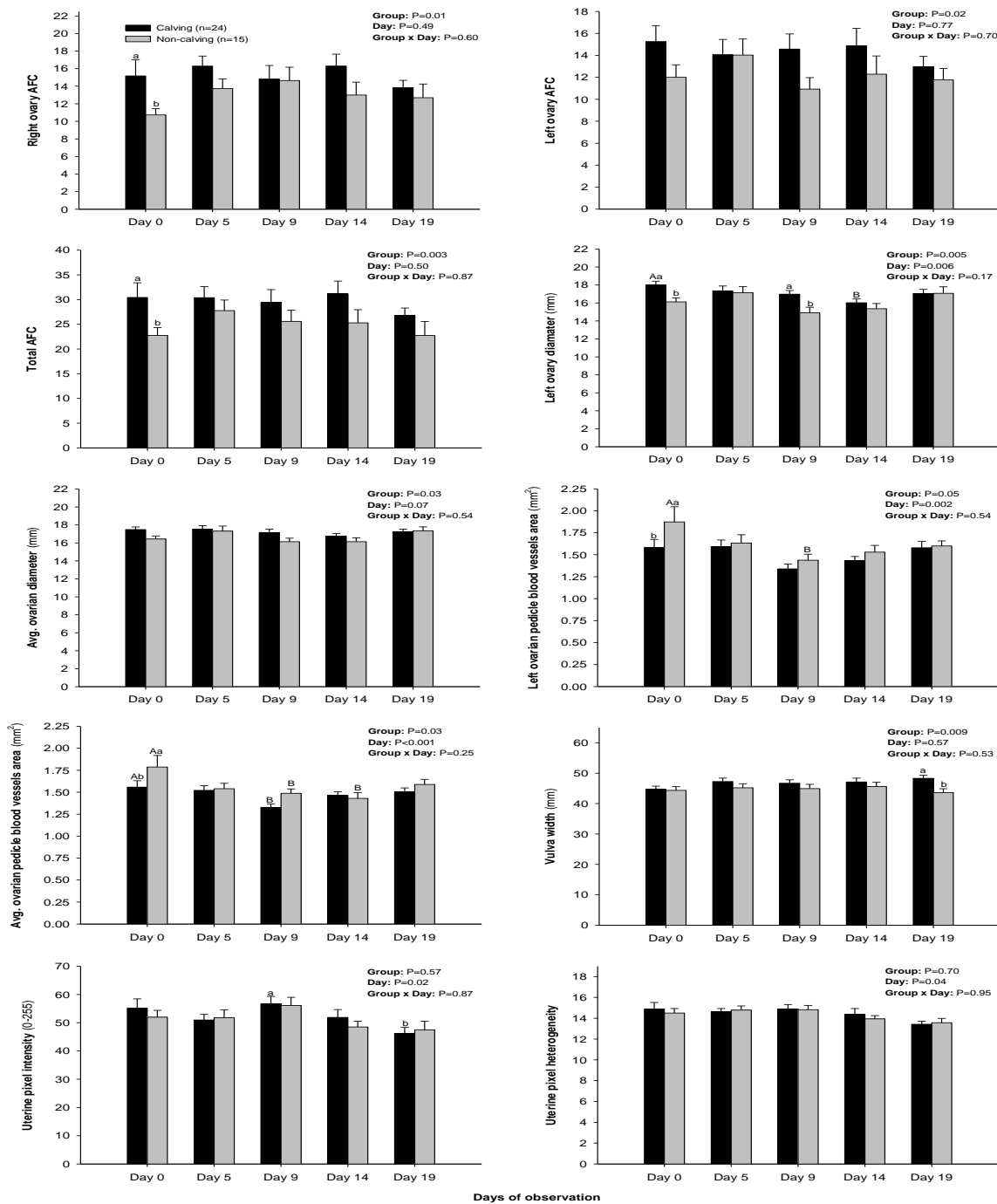


Figure 2. Main effect of the group of prepubertal heifers that calved in the first breeding season, second breeding season, or heifers that did not calve in the subsequent seasons, the effect of assessment days and interaction between effects for characteristics antral follicle count (AFC), ovarian diameter, area of ovarian pedicle blood vessel area, vulva width, uterine echogenicity (NPV – numeric pixel values) and uterine echotexture (NPV standard deviation).

