



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA ZANDONADI MACHADO

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS FOLÍCULOS OVARIANOS
DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) CONFORME A
CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

FERNANDA ZANDONADI MACHADO

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS FOLÍCULOS OVARIANOS
DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) CONFORME A
CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2016

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

Zandonadi Machado, Fernanda.

Proliferação celular dos folículos ovarianos de fêmeas nelore (*bos indicus*) conforme a contagem de folículos antrais. / Fernanda Zandonadi Machado. - Londrina, 2016.
54 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Coorientador: Kátia Cristina Silva Santos .

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bovino desenvolvimento folicular, imunohistoquímica e ovários - Teses. I. Marcondes Seneda, Marcelo . II. Cristina Silva Santos , Kátia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

FERNANDA ZANDONADI MACHADO

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS FOLÍCULOS OVARIANOS
DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) CONFORME A
CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Wanessa Blaschi
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Londrina, 26 de fevereiro, 2016.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC

2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DEDICATÓRIA

À Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem fê eu não teria chegado nem na metade do caminho.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou, estando sempre presente. Obrigada pelo carinho, companherismo e por serem meu porto seguro. Obrigada por serem o meu melhor exemplo.

Ao meu namorado Enrique, que foi fundamental na minha trajetória até aqui, sempre me direcionando para o melhor caminho e me apoiando nas minhas decisões. Obrigada por ficar ao meu lado nos meus momentos de desespero, pelos conselhos e por todo carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo M. Seneda, pelo exemplo profissional e pessoal, pela confiança depositada, por sua grande disposição e pelos ensinamentos e conselhos valiosos.

À minha coorientadora Katia Cristina Silva Santos e ao Gustavo Martins Gomes Dos Santos pela amizade e fundamental ajuda, pela disponibilidade e pelos ensinamentos ao longo destes anos.

À toda equipe do laboratório de reprodução animal da UEL por colaborarem para a execução deste trabalho. Em especial Larissa, Camila Bizzarro e Suellen que ajudaram rotineiramente neste processo.

Aos laboratórios de anatomia patológica e virologia da UEL por toda disponibilidade. Em especial ao Otonel, por toda ajuda e paciência neste período.

Às minhas amadas companheiras Ariadne Souza, Camila Rosa e Francine Giotto por terem dividido comigo cada momento desses últimos dois anos, fazendo cada dia valer a pena.

À Universidade Estadual de Londrina por tornar possível a realização deste sonho.

Aos Professores da UEL que contribuíram para a minha formação profissional.

MACHADO, Fernanda Zandonadi. **Proliferação celular dos folículos ovarianos de fêmeas nelore (*Bos indicus*) conforme a contagem de folículos antrais**. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

No intuito de comparar taxas de proliferação celular entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta, média e baixa contagem de folículos antrais (CFA), ovários (n = 336) foram obtidos aos pares em abatedouro local e transportados até o laboratório. A classificação dos grupos a partir da contagem visual dos folículos, foi definida utilizando a média \pm desvio padrão, em G-Alta (≥ 92 folículos), G-Média (46-76 folículos) e G-Baixa (≤ 31 folículos; $p \leq 0,05$). A partir desta classificação, a atividade proliferativa folicular foi estabelecida em três grupos experimentais (alta n=5, média n=5 e baixa n=5). Estes ovários foram seccionados em fragmentos de 1 x 1 x 0,3cm, fixados em solução de formalina tamponada a 10%, processados e submetidas à avaliação imunohistoquímica para o anticorpo anti-PCNA. A imunoposição para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) foi detectada em todos os estágios do desenvolvimento folicular. Foi encontrado o total de 1.688 folículos imunomarcados, dos quais 1.388 eram primordiais, 197 primários, 29 secundários e 74 antrais. Os dados de imunomarcagem do PCNA de cada grupo foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene) e posteriormente comparados usando Teste de Fisher ($p \leq 0,05$). Os grupos de G-Média e G-Baixa expressaram maior proliferação celular nos estágios finais do desenvolvimento folicular. Em contraponto, o grupo G-Alta obteve maior imunomarcagem em folículos primordiais, com decréscimo até a fase de folículo antral. Os resultados obtidos através de avaliação imunohistoquímica sugerem que a população folicular antral, influencia na taxa de proliferação celular em fêmeas Nelore (*Bos indicus*).

Palavras-chave: Bovino. Desenvolvimento folicular. Imunohistoquímica. Ovários.

MACHADO, Fernanda Zandonadi. **Cell proliferation of ovarian follicles of Nelore cow (*Bos indicus*) according to antral follicle count.** 2016. 54 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2016.

ABSTRACT

In order to compare cell proliferation rates between Nelore (*Bos indicus*) females with high, medium and low antral follicle count, ovaries (n = 336) were obtained in pairs at a local slaughterhouse and transported to the laboratory. The classification of groups was defined using mean \pm standard error of the mean (SEM) into: G-High (≥ 92 follicles), G-Medium (46 – 76 follicles) and G-Low (≤ 31 follicles; $p \leq 0,05$). After this evaluation the proliferative activity in the follicles was established into three experimental groups (high n=5, medium n=5 and low n=5). These ovaries were cut into fragments of 1 x 1 x 0,3cm, fixed in buffered formalina 10% solution, processed and subjected to immunohistochemical analysis for anti-PCNA antibody. The imune expression of PCNA was presente in all follicular development stages. Was found the amount of 1,688 immunomarkers follicles, of which 1,388 were primordial, 197 primary, 29 secondary and 74 antral. Immunostaining data for each animal underwent the waste normality test (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (Levenne) and then compared using Fisher's test. G-Medium and G-Low groups showed lower proliferation rate in early stages, and in the course of developing this rate increased progressively. On the other hand, the G-High group had greater cell proliferation immunostaining in primordial follicles, with decreased until the antral follicle stage. The results obtained through immunohistochemistry evaluation suggest that antral follicular population, influences in the cell proliferation rate in Nelore females (*Bos indicus*).

Keywords: Bovine. Follicular development. Immunohistochemistry. Ovaries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema representando os fatores envolvidos na formação das células germinativas primordiais(CGP),oogênese e foliculogênese..... 19
- Figura 2.** Desenvolvimento folicular do estágio primordial á pré-ovulatório. 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário..... 21
- Figura 3.** Alterações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento folicular..... 22
- Figura 4.** Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular..... 23
- Figura 5.** Distribuição da média referente à contagem visual de folículos antrais dos pares de ovários 41
- Figura 6.** Porcentagem de folículos imunomarcados por categoria folicular (primordial, primário, secundário e antral) em relação aos grupos de fêmeas *Bos indicus* de alta, média e baixa CFA..... 44
- Figura 7.** Ilustração da técnica imunohistoquímica de folículos ovarianos marcados na cor castanha para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A- imunomarcção de núcleo, citoplasma e células da granulosa (seta) em folículo secundário inicial. BImunomarcção de núcleo, citoplasma, células da granulosa (g) e teca (t) em folículo secundário. C- Camadas da granulosa (g) e teca (t) de folículo antral. D- Imunomarcção de núcleo e citoplasma de folículos primordiais (seta preta), primários (seta vermelha) e imunomarcção de multioócitos (M)..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de folículos imunomarcados (primordiais, primários, secundários e antrais) em relação ao total de marcados de cada grupo animal (alta, média e baixa CFA).....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Hormônio Anti-Mulleriano
°C	Graus Celsius
CFA	Contagem de folículos antrais
CGP	Células Germinativas Primordiais.
cm	Centímetro
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
Km	Quilômetro
LH	Hormônio luteinizante
NaCl	Cloreto de sódio
OPU	Ovum pick up
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PFA	População folicular antral
µL	Microlitro
um	Micrômetro
VG	Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	OVÁRIO EM FÊMEAS DE MAMÍFEROS.....	18
2.2	OOGÊNESE.....	18
2.3	FOLICULOGÊNESE.....	20
2.4	FOLÍCULO OVARIANO.....	21
2.5	FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS.....	22
2.6	FOLÍCULOS ANTRAIS.....	24
2.7	FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS.....	25
2.8	POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL.....	25
2.9	IMUNOHISTOQUÍMICA- PCNA.....	26
	REFERÊNCIAS	28
3.	HIPÓTESE	36
4.	OBJETIVOS	37
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5.	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	38
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1	<i>Obtenção dos ovários</i>	40
2.2	<i>Determinação da contagem de folículos antrais</i>	40
2.3	<i>Processamento histológico</i>	41
2.4	<i>Imunohistoquímica</i>	42
2.5	<i>Análise estatística</i>	43
3.	RESULTADOS.....	43
4.	DISCUSSÃO.....	46

REFERÊNCIAS	49
6. CONCLUSÕES	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior produção mundial de embriões *in vitro* (STROUD, 2012; IETS, 2013). Este sucesso está correlacionado com o predomínio da raça Nelore nos seus rebanhos. A fêmea Nelore (*Bos indicus*) obtêm características reprodutivas distintas em relação a outras raças, dentre essas a grande população folicular antral (PFA) nos ovários. A produção média de oócitos por sessão de aspiração folicular é contabilizado em 25 oócitos, mesmo dispondo de nenhum procedimento adicional ou controle do ciclo estral (Thibier et al., 2004; Rubin et al., 2004). Deve-se considerar também que ocorre discrepância da população folicular entre fêmeas da mesma raça (*Bos indicus*), a qual pode proporcionar até 564 oócitos em um único procedimento de aspiração folicular (Santos et al., 2005). Assim, devido a quantidade de folículos antrais presentes nos ovários destas vacas, ocorre maior recuperação oocitária por procedimento de *Ovum Pick Up* (OPU) do que em fêmeas *Bos taurus* (Viana; Camargo, 2007; Batista et al., 2014), o que repercute a maior produção de embriões (Thibier et al., 2004; Pontes et al., 2011).

A projeção do Brasil em âmbito internacional gera interesse de diversos países a aquisição desta genética. Por isso, pesquisas relacionadas ao aprimoramento das técnicas reprodutivas, como colheita e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, inseminação artificial em tempo fixo e manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais permanecem em ascensão. Contudo, estudos que correlacionem a quantidade de folículos antrais com fatores envolvidos na ativação, proliferação, crescimento e desenvolvimento de folículos ovarianos de fêmeas Nelores (*Bos indicus*) são escassos.

A Contagem de folículos antrais (CFA) pode ser realizada visualmente, pois esta possui correlação positiva com a população real de folículos antrais em ovários (Fitzpatrick; Entwistle, 1997; Ireland et al., 2007; Cushmann et al., 2009). O ultrassom também pode ser utilizado de forma segura durante ondas foliculares para identificar a população folicular antral (Burns et al., 2005; Silva-Santos et al., 2014c). O impacto da PFA nos aspectos reprodutivos de fêmeas *Bos indicus* ainda não está elucidado. Deste modo algumas hipóteses foram levantadas para explicar a elevada população de folículos antrais nestas fêmeas.

A primeira hipótese sugere que ocorra uma fase prolongada de multiplicação das oogônias nestas fêmeas. A seguinte propõe que exista uma quantidade muito maior de folículos pré-antrais em fêmeas *Bos indicus* em relação à *Bos taurus*, no entanto, esta hipótese foi refutada por Silva-Santos et al. (2011). Além disso, foi proposto a

1 renovação das células germinativas na fase adulta pelos pesquisadores Johnson et al. (2004).
2 Estes demonstraram indícios consistentes da continuidade da oogênese e foliculogênese
3 durante a vida juvenil e adulta de camundongas. Também, considera-se a proposta que fêmeas
4 *Bos indicus* obtenham uma menor taxa de atresia e/ou maior taxa de proliferação folicular em
5 relação à *Bos taurus*. Até o momento, não há uma explicação estabelecida para tal contexto e
6 vários grupos seguem investigando o assunto. Uma das estratégias mais consideradas é a
7 busca por uma melhor compreensão da proliferação celular durante o crescimento folicular.

8 Biomarcadores imunohistoquímicos como o antígeno nuclear de
9 proliferação celular (PCNA) são amplamente utilizados para caracterizar diferentes aspectos
10 do desenvolvimento celular. Oktay et al. (1995) demonstraram em seus estudos que os
11 marcadores para proliferação, são reguladores essenciais do ciclo celular, e sensíveis para
12 identificar a atividade celular e o início do crescimento folicular ovariano. Esta técnica
13 imunohistoquímica é consolidada para a detecção de proliferação celular em ovários
14 mamíferos, e é capaz de demonstrar atividade proliferativa nos diferentes estágios de
15 desenvolvimento dos folículos ovarianos (Reynaud et al., 2009).

16 O objetivo do presente estudo foi avaliar a proliferação celular nos
17 diferentes folículos ovarianos conforme a contagem de folículos antrais.

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIO EM FÊMEAS DE MAMÍFEROS

A superfície do ovário é coberta por um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, chamado epitélio germinativo; logo abaixo, há a túnica albugínea composta por tecido conjuntivo denso. Abaixo da túnica albugínea encontra-se a região cortical, onde predominam os corpos lúteos (corpos albicans e hemorrágicos) e os folículos ovarianos que contêm os oócitos, estes apresentam-se em vários estágios de desenvolvimento ou atresicos. Assim como, tecidos conectivos (colágeno – do tipo I e III, fibras reticulares e fibroblasto; Hafez e Hafez, 2004; Silva, 2015). Deste modo a camada cortical representa a região funcional do ovário (Silva, 2005). A parte mais interna do ovário é a região medular (na maioria das espécies), que contêm tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (Aughey; Frye, 2001; Junqueira; Carneiro, 2008). Sua função consiste na sustentação e nutrição do ovário (Hafez e Hafez, 2004).

Os ovários têm uma função exócrina, para a produção do óvulo ou gameta feminino, e um sistema endócrino, cuja função é a produção de hormônios sexuais femininos (Aughey; Frye, 2001). O seu formato e tamanho varia conforme a espécie animal e a fase do ciclo estral. Em bovinos, os ovários têm formato de amêndoa (Hafez e Hafez, 2004).

2.2 OOGÊNESE

Ao longo de toda a vida reprodutiva de uma fêmea, a funcionalidade do ovário é influenciada pela interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, que juntos, atuam no processo de desenvolvimento folicular e oocitário, conhecidos como foliculogênese e oogênese. Em ruminantes, a formação dos folículos ovarianos e dos oócitos contidos neles iniciam-se no período pré-natal. A oogênese e a foliculogênese são processos simultâneos que antecedem a ovulação e liberação do oócito maduro (Figueiredo et al., 2008).

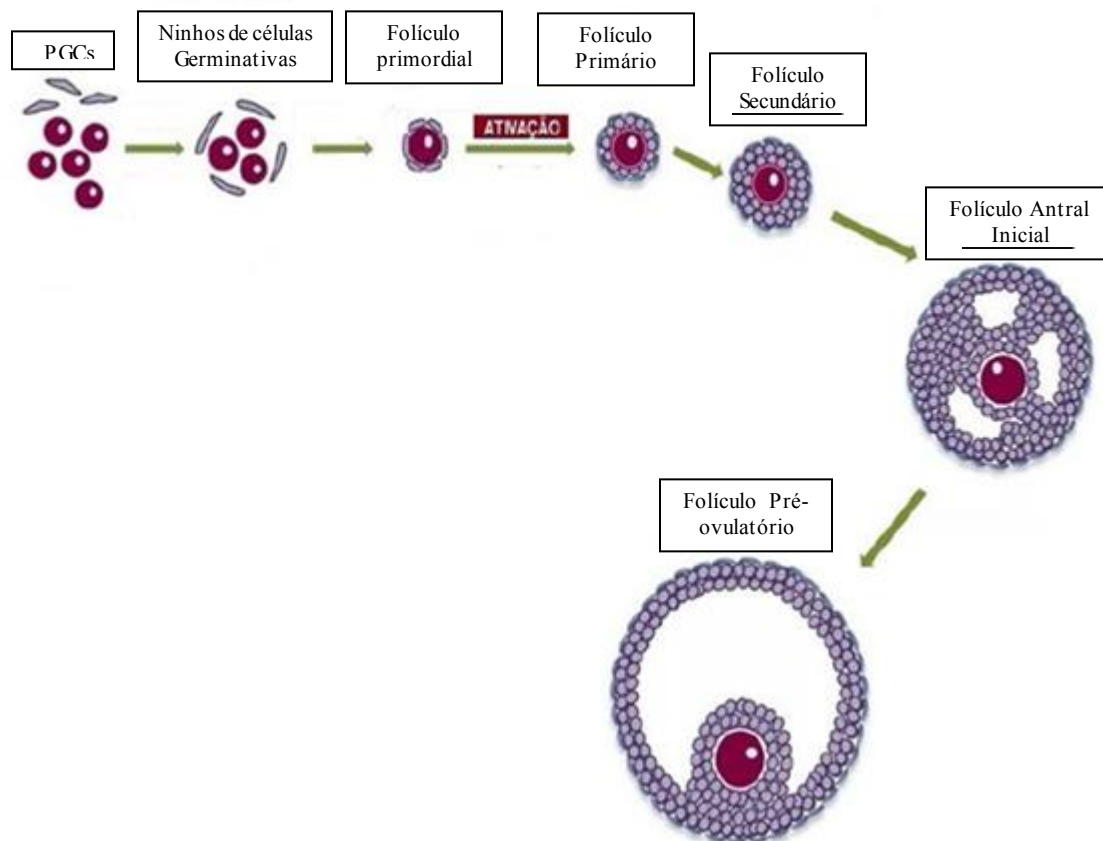
A oogênese consiste na formação e modificação das células germinativas primordiais (CGP, Figura 1) até alcançar o estágio de formação do oócito haplóide fecundado (Rüsse, 1983). Este processo ocorre ainda durante a vida fetal juntamente com a foliculogênese e, apenas alguns dos oócitos presentes no *pool* de reserva conseguirão atingir o processo de desenvolvimento até a fecundação (Wassarman, 1988; Bessa; Dode, 2013). De

1 acordo com Van Den Hurk; Zhao (2005), o processo de formação de oócitos inclui sete
 2 etapas: a geração de células germinativas primordiais; a migração de CGP para as gônadas; a
 3 colonização das gônadas por CGP; a diferenciação de CGP em oogônias; a proliferação de
 4 oogônias; o início da meiose e a parada na fase diplóteno da prófase I da meiose.

5

6 **Figura 1.** Células germinativas primordiais (CGP), oogênese e foliculogênese.

7



8

9

10 Fonte: Adaptado de Sánchez; Smitz (2012).

11

12 Cerca de três semanas após a fertilização, as CGP surgem e migram por
 13 movimentos ameboides do epitélio do saco vitelino, através do tecido conjuntivo do intestino
 14 posterior para a crista genital. Durante sua jornada, as CGP multiplicam-se rapidamente e por
 15 volta de sete semanas de gestação as células derivadas do mesonefro e do epitélio celomático
 16 migram para dentro da crista genital, formando cordões medulares primitivos e cordões
 17 sexuais, respectivamente. Os cordões primitivos são colonizados por CGP e, nos fetos do sexo
 18 feminino são chamados de oogônias (Smitz; Cortvrint, 2002; Van Den Hurk; Zhao, 2005).

19 Após as múltiplas divisões mitóticas das células germinativas primordiais,
 20 originam-se dois tipos diferentes de células. A primeira linhagem de células germinativas tem

1 por início imediato de sucessivas divisões mitóticas ocasionando a origem de uma linha de
2 células oogônias, Enquanto que a segunda, permanece em intérfase para divisões periódicas
3 que darão origem às novas células germinativas que posteriormente se diferenciarão em
4 oócitos (Hirshfield, 1991).

5 Como continuação do processo de oogênese, ocorre a interrupção das
6 células que encontram-se em estágio da primeira divisão meiótica e a constituição de oócitos
7 primários, que persistem neste estágio até a puberdade (Hirshfield, 1991).

8 Quando o animal atinge a puberdade, em razão da liberação do hormônio
9 luteinizante (LH), a meiose é retomada, poucas horas antes da ovulação, e o núcleo oocitário
10 entra em diacinese, iniciando-se o processo de rompimento da vesícula germinativa (VG),
11 seguido das fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, ocorrendo à expulsão do primeiro
12 corpúsculo polar, formando então o oócito secundário, com o núcleo na segunda divisão
13 meiótica. Esta fase é rápida, passando pela prófase II e metáfase II, onde ocorre a segunda
14 parada da meiose. O oócito só retomará a meiose se for fecundado. Uma vez fecundado pelo
15 espermatozoide, passará para anáfase II e telófase II, seguido da expulsão do segundo
16 corpúsculo polar e da formação do oócito haplóide fecundado, finalizando a oogênese
17 (Figueiredo et al., 2008).

18

19 2.3 FOLICULOGÊNESE

20

21 O período da foliculogênese compreende o processo de formação,
22 crescimento e maturação do folículo primordial até o estágio de folículo pré-ovulatório. Os
23 folículos primordiais que estão em repouso na prófase I da meiose saem da fase de dormência
24 e começam a crescer, passando pelos intermediários e entrando na fase pré-antral. Folículos
25 quiescentes são frequentemente mobilizados para a fase de crescimento e ocorrem
26 continuamente durante os anos reprodutivos, até o esgotamento da reserva, na senescência
27 (Baerwald, 2009). A formação dos folículos primordiais ocorre no momento em que os
28 oócitos são individualizados pela separação dos cordões das células germinativas (Bristol-
29 gould, Woodruff, 2006; Bessa; Dode, 2013).

30

31 O tempo estimado para que um folículo se desenvolva de primordial até o
32 estágio antral é ao redor de 160 dias. Enquanto o tempo necessário para folículos do estágio
33 pré-antral (Folículo secundário) passarem a ovulatório maduro tem sido estimado em cerca de
42 dias nos bovinos (Baerwald, 2009).

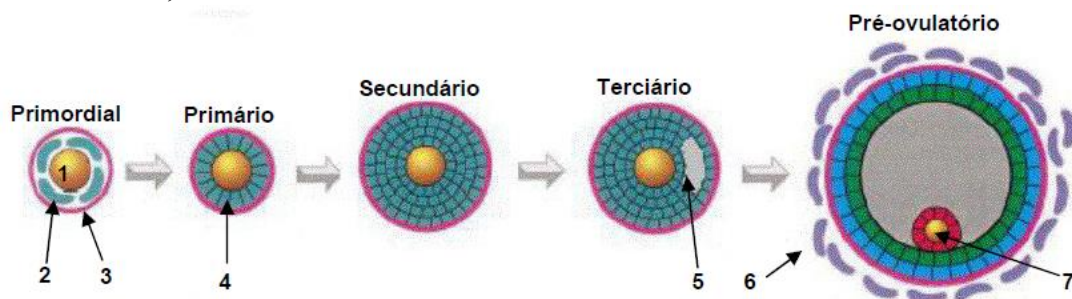
1 A partir da maturidade sexual, os folículos ovarianos podem seguir dois
 2 caminhos: ovulação ou atresia. A grande maioria dos folículos não chega à ovulação, sendo
 3 eliminados por meio da atresia folicular. Existem dois tipos de atresia: a atresia de folículos
 4 pré-antrais e antrais. Na atresia de folículos pré-antrais, as alterações degenerativas ocorrem
 5 primariamente no oócito. Já a atresia de folículos antrais, as primeiras alterações ocorrem nas
 6 células da granulosa (Hsueh et al., 1994).

7 Mesmo com os inúmeros estudos e o desenvolvimento de diversas técnicas
 8 reprodutivas, as informações existentes sobre o processo de foliculogênese, os mecanismos de
 9 proliferação, maturação e a atresia folicular ainda são pouco compreendidos.

11 2.4 FOLÍCULO OVARIANO

13 O folículo ovariano é a unidade estrutural e funcional do ovário e
 14 desempenha duas funções principais: uma endócrina (produção e liberação de hormônios
 15 esteroides) e a outra exócrina ou gametogênica. Esta é essencial para manutenção,
 16 crescimento e maturação de oócitos primários ou imaturos, culminando com a liberação de
 17 um oócito maturado na ovulação. Nos bovinos, os folículos localizam-se no córtex ovariano,
 18 sendo classificados em folículos pré-antrais (não cavitários) e folículos antrais ou cavitários
 19 (Figueiredo et al., 2008; Figura 2). Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados de
 20 primordiais, primários e secundários; e os folículos antrais compreendem aos folículos
 21 terciários e pré-ovulatórios ou de Graaf (Figueiredo et al., 2008; Lima-Verde et al., 2011).

23 **Figura 2.** Desenvolvimento folicular do estágio primordial á pré-ovulatório. 1. Oócito
 24 primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5.
 25 Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.



26
 27 Fonte: Adaptado de Rodgers et al., 1999.

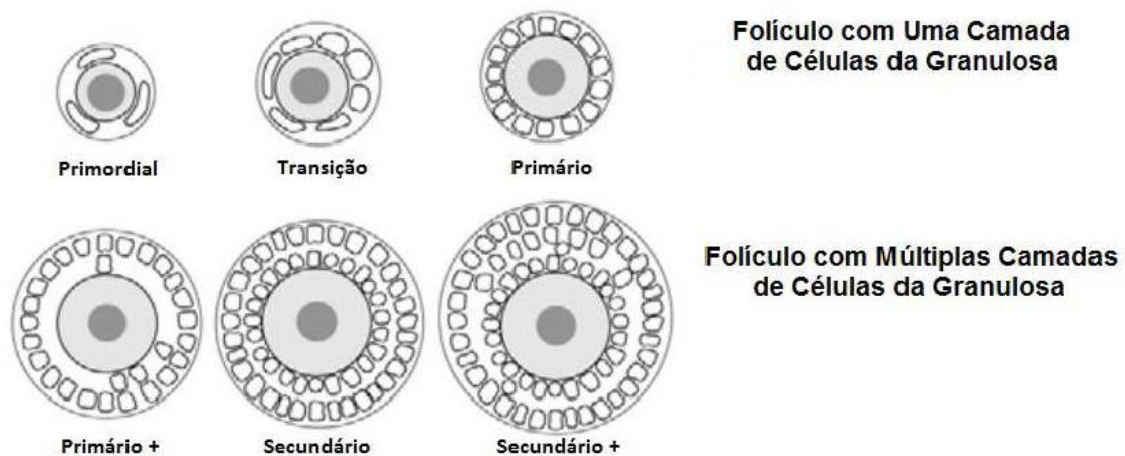
28
 29 A composição do folículo ovariano consiste num oócito circundado por
 30 células somáticas (granulosa e tecais). Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é

1 alterada, visto que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e se
 2 diferenciam (Bristol-gould, Woodruff 1997; Lima-Verde et al., 2011). A diferenciação das
 3 células da granulosa pode ocorrer na presença de estradiol, momento em que se encontram
 4 receptores de FSH (Fortune, 1994; Lima-Verde et al., 2011). Adicionalmente, outros
 5 pesquisadores observaram que a associação de estradiol e FSH estabelece um crescimento
 6 folicular em fêmeas bovinas (Lima-Verde et al., 2011).

8 2.5 FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS

10 Os folículos pré-antrais constituem a grande maioria dos folículos
 11 ovarianos, e são classificados de acordo com o formato, tamanho e o número de camadas das
 12 células da granulosa que envolve o oócito imaturo, em primordiais, primários e secundários
 13 (Bessa; Dode, 2013; Figura 3).

14 **Figura 3.** Alterações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento folicular.



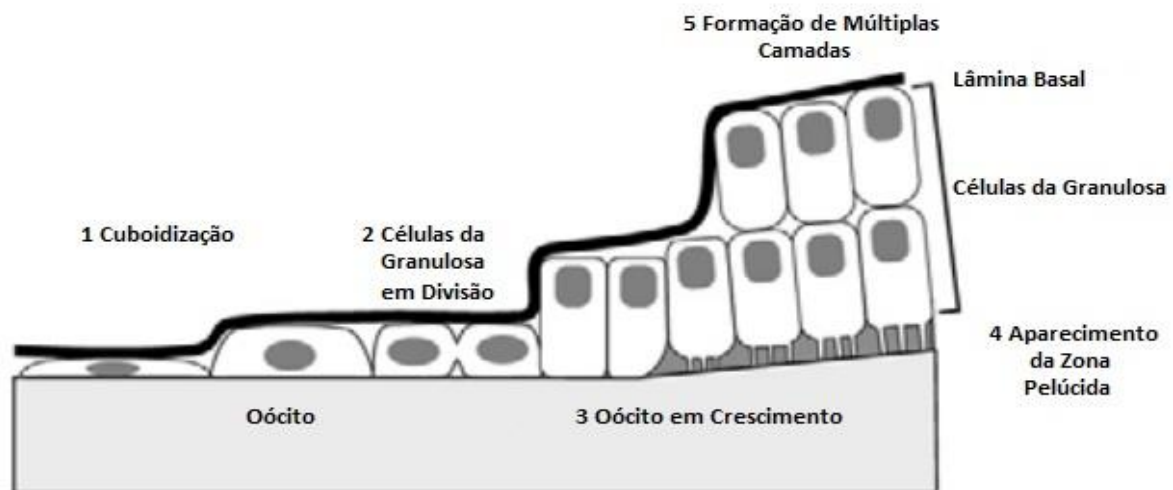
16 Fonte: adaptado de Silva-Buttkus *et al.* (2008).

18 Os folículos primordiais constituem 90% de toda a população folicular
 19 presente no ovário (Figueiredo et al., 2008), e consistem no estágio inicial do
 20 desenvolvimento folicular localizados no *pool* de reserva. Nos folículos primordiais as células
 21 germinativas são achatadas e estão em contato com o oócito, mediadas por junções
 22 desmossômicas (tipo like). As células da granulosa são envolvidas por uma lâmina basal e
 23 seus núcleos são achatados. As células dos folículos primordiais tem formato fino com
 24 extensões citoplasmáticas delgadas (Silva-Buttkus et al., 2008).

1 Durante esta fase alguns folículos são ativados e iniciam o processo de
 2 crescimento e diferenciação (Telfer et al., 2008). Cada folículo primordial é composto por um
 3 oócito rodeado por uma camada de quatro a oito células da granulosa achatada (Hulshof et al.,
 4 1994). Em bovinos, o diâmetro folicular no estágio primordial pode variar de 30 a 40 μm ,
 5 com um oócito entre 20 a 25 μm (Beckers et al., 1996).

6 Na formação dos folículos primários a atividade proliferativa das células da
 7 granulosa culmina na formação de uma camada de células cuboide ao redor do oócito. Com
 8 crescimento dos folículos, as células germinativas passam para o formato cuboide com o
 9 núcleo mais próximo da lâmina basal (Figura 4). Nesta fase, os folículos intermediários
 10 possuem um oócito circundado tanto por células germinativas com formato pavimentoso
 11 quanto por células cuboide (Silva-Buttkus et al., 2008). Desse modo, os folículos primários
 12 apresentam um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa em formato
 13 cuboide. Os folículos primordiais e primários não podem ser diferenciados através das
 14 medidas de diâmetro, mas apenas pelas alterações morfológicas (Hulshof et al., 1994).

15
 16 **Figura 4.** Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular.
 17



18
 19 Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008).

20
 21 O aparecimento dos folículos secundários ocorre com o surgimento da
 22 segunda camada das células da granulosa. A formação da zona pelúcida começa a partir do
 23 início do crescimento dos folículos primordiais, sendo claramente visualizada em folículos
 24 secundários (Figueiredo et al., 2008).

1 Nos folículos secundários em estádios mais avançados, observa-se o
2 aparecimento das células da teca, recrutadas de precursores tecais presentes no estroma
3 ovariano. A camada de células da teca começa a se formar nos folículos em crescimento em
4 torno da membrana basal, e então, se diferencia em teca interna e teca externa (Rajkovic et al.,
5 2006).

6 7 2.6 FOLÍCULOS ANTRAIS

8
9 Os folículos que compõem a categoria dos folículos antrais são os terciários
10 e de Graaf também denominados como maduros ou pré ovulatórios. A principal característica
11 dos folículos antrais é o aparecimento do antro folicular.

12 Durante a formação dos folículos antrais, a relação entre a proliferação
13 células germinativas e o crescimento do oócito muda com o desenvolvimento das camadas
14 destas células. Com o início da formação das múltiplas camadas, observa-se o
15 desenvolvimento de duas novas populações de células germinativas, uma em contato com o
16 oócito e a outra, em contato com a lâmina basal. Posteriormente, as camadas mais internas
17 não terão contato com nenhuma delas. Essas células internas, que perderam contato com a
18 lâmina basal se dividem mais frequentemente, devido a perdas de contato físico e de
19 sinalização de restrições impostas pelo contato com essa matriz extracelular. Após o
20 desenvolvimento da segunda camada de células germinativas, a grande maioria das células
21 apresentam mitoses orientadas perpendicularmente à lâmina basal (Silva-Buttkus et al., 2008).

22 Com a atividade proliferativa intensa das células da granulosa, ocorre o
23 surgimento de uma área preenchida por líquido folicular, conhecido como antro folicular
24 (Figueiredo et al., 2008; Bessa; Dode, 2013).

25 O início da formação de antro nos bovinos ocorre quando os folículos
26 atingem o tamanho de 250µm. Os folículos antrais ainda possuem um oócito imaturo, ao
27 passo que na maioria das espécies, somente o folículo pré-ovulatório ou de Graaf contém um
28 oócito maturado (Figueiredo et al., 2008).

29 Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona
30 pelúcida, uma pequena cavidade antral e várias camadas de células tecais. Já os folículos de
31 Graaf representam o estágio final do desenvolvimento folicular (Gordon, 1994).

2.7 FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS

Hipóteses já foram aventadas em relação á origem dos folículos multioóciotos. Uma delas é a de que estes folículos derivem uma falha das células germinativas durante o início das fases da foliculogênese. Outra seria o rápido desenvolvimento das células germinativas quando comparadas a diferenciação das células somáticas que circundam os oócitos, resultando na inclusão de várias células germinativas dentro de um folículo (Bristol-Gould; Woodruff, 2006), que pode ou não depender de esteroides sexuais e gonadotrofinas (Telfer; Gosden, 1987).

A prevalência dos multióciotos é mais frequente em neonatos e animais jovens e tendem a ocorrer com pouca frequência em animais adultos (Telfer; Gosden, 1987; Payan-Carreira; Pires, 2008). Estas estruturas são geralmente descritas em fetos durante a fase de formação de folículos primordiais (Silva Santos et al, 2011). A decrescente frequência de folículos multioócitos em animais mais velhos sugere que o ambiente ovariano seja menos capaz de prover suporte fisiológico para o crescimento dos folículos, e isso pode ser justificado pela maior escassez folicular, conforme o avanço da idade (Telfer; Gosden, 1987). No entanto, a prevalência destes folículos em ovários de animais adultos também está de acordo com relatos prévios para outras espécies (Al-Mufti et al, 1988; Reynaud et al, 2010; Silva-Santos et al, 2011; Silva-Santos et al., 2014).

A frequência de folículos multioócitos é extremamente variada entre as espécies e dentro da mesma espécie, podendo variar também entre os indivíduos. As três espécies com maior frequência destes folículos são os gambás, podendo chegar a até 100 oócitos por folículo; os cães (quase 70% dos cães têm pelo menos um folículo multioócito em seu ovário) e os gatos, com prevalência de até 4% dos folículos (Reynaud et al., 2010).

A presença de folículos multioótitos em fêmeas bovinas já é bem estabelecida (Silva-Santos et al., 2011, 2014). Até o momento, não é bem compreendido o papel dos folículos multioócitos nos ovários desta espécie.

2.8 POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL

A contagem de folículos antrais (CFA) possui alta repetibilidade no mesmo indivíduo, mas a população de folículos antrais (PFA) possui grande variabilidade individual indivíduo (Ireland et al., 2007, 2008; Mossa et al., 2010; Silva-Santos et al., 2014). Existem fatores que influenciam diretamente na variação da população folicular, tais como, idade

1 (Rüsse, 1983), genética (Erickson, 1966), níveis hormonais (Peters, 1976), estado nutricional
2 (Szlachta; Tischner, 2008) e reprodutivo. A raça ou subespécie, também exerce grande
3 influência na CFA, principalmente quando se compara *Bos taurus* e *Bos indicus* (Burns et al.,
4 2005; Ireland et al., 2007). A CFA é obtida a partir do número folículos ≥ 3 milímetros de
5 diâmetro em ambos os ovários (Evans et al., 2012). A contagem visual é um método que
6 apresenta correlação positiva com a população real de folículos antrais nos ovários em fêmeas
7 *Bos taurus* (Fitzpatrick; Entwistle, 1997; Cushmann et al., 2009).

8 A avaliação ultrassonográfica é outra forma segura para identificar a
9 população folicular antral durante ondas foliculares em vacas taurinas (Holandesa), mestiças e
10 zebuínas (Nelore; Burns et al., 2005; Silva-Santos et al., 2014c). Outro recurso eficiente para
11 classificação animal quanto á quantidade de folículos antrais presentes nos ovários, é a
12 dosagem do hormônio AMH (hormônio anti-mulleriano), pois este apresenta correlação
13 positiva da CFA com a concentração de AMH no plasma sanguíneo de fêmeas Nelores (*Bos*
14 *indicus*) e Holandesas (*Bos taurus*; Batista et al., 2014).

15 A variação da PFA entre indivíduos adultos é altamente expressiva, e está
16 relacionada positivamente com os índices de fertilidade e função ovariana em fêmeas
17 Holandesas (*Bos taurus*; Ireland et al., 2009). No entanto, fêmeas zebuínas demonstram um
18 padrão bem diferente. De modo que fêmeas *indicus* e *taurus indicus* não apresentam melhor
19 desempenho reprodutivo associado á alta CFA (Santos et al., 2012, 2013.; Morotti et al, 2014;
20 Santos et al., 2015, dados não publicados).

21

22 2.9 IMUNOHISTOQUÍMICA- PCNA

23

24 A imunohistoquímica é uma técnica baseada na ligação anticorpo-antígeno
25 para a detecção e caracterização de moléculas no seu local de origem a partir de imuno-
26 ensaios que localizam um epítipo de interesse em cortes de tecido. Esta técnica permite a
27 localização de antígenos nos componentes histológicos e celulares, mantendo a arquitetura
28 original do tecido circundante (Ferro, 2013).

29 O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um anticorpo
30 específico para detecção de atividade proliferativa celular por meio de imunohistoquímica. O
31 PCNA é uma proteína nuclear ácida de 36-kDa, encontrada em todas as espécies eucarióticas
32 (Strzalka; Ziemienowicz, 2011), que funcionava como proteína auxiliar da DNA polimerase
33 delta, associada tanto a replicação do DNA como ao reparo do mesmo (McMormick; Hall21,
34 1992). Neste contexto, como atuante no processo da DNA polimerase, o PCNA se torna fator

1 necessário para a síntese de DNA durante a replicação, também está associado com a
2 remodelação da cromatina, a coesão de cromátides irmãs e controle do ciclo celular. Durante
3 a divisão celular (Strzalka; Ziemienowicz, 2011), apresenta uma expressão mais elevada no
4 núcleo durante a fase tardia de G1, aumentando durante a fase S, e diminui durante a fase G2
5 e (Meer et al, 2003; Myoung et al., 2006). Além disso, a meia-vida longo desta proteína (cerca
6 de 20 horas) resulta em uma imunexpressão de células que possivelmente já tenham deixado
7 o ciclo de divisão celular (Meer et al, 2003; Myoung et al., 2006).

8 Oktay et al. (1995) demonstraram em seus estudos que os marcadores para
9 proliferação, reguladores essenciais do ciclo celular, são sensíveis para identificar a atividade
10 celular e o início do crescimento folicular. Dessa forma, a avaliação morfológica e
11 proliferativa de folículos ovarianos através de marcadores de proliferação celular pode
12 contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na foliculogênese de folículos
13 contendo um oócito e folículos multioócitos em fêmeas bovinas.

1 **REFERÊNCIAS**

- 2
- 3 AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÉS, J. Ph. Oocyte size and
4 intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journals of Reproduction &**
5 **Fertility**, v.82, p.15-25, 1988.
- 6
- 7 AUGHEY, E.; FRYE, F.L. Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates. UK:
8 **Manson Publishing Ltd**, 2001.
- 9
- 10 BAERWALD, A.R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine
11 and equine models. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p.20-29, 2009.
- 12
- 13 BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.;
14 DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S.
15 Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos
16 indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**,
17 v.49, p.448-452, 2014.
- 18
- 19 BECKERS, J.F.; DRION, P.; FIGUEIREDO, J.R.; GODDIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS,
20 F.; The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction in**
21 **Domestic Animals**, v.31, p. 543–548, 1996.
- 22
- 23 BESSA, I.R.; DODE, M.A.N. Ovogênese e modificações epigenéticas. **Revista Brasileira de**
24 **Reprodução Animal**, v.37(3), p.241–248, 2013.
- 25
- 26 BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*).
27 **Theriogenology**, v.66, p.5–13, 2006.
- 28
- 29 BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J.
30 Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation
31 among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum
32 follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.
- 33

- 1 CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.;
- 2 FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef
- 3 cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal**
- 4 **of Animal Science**, v.87, p.1971–1980, 2009.
- 5
- 6 ERICKSON, B.H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of**
- 7 **Animal Science**, v.25, p.800–805, 1966.
- 8
- 9 EVANS, A.C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.;
- 10 IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of Maternal Environment During
- 11 Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring.
- 12 **Reproduction in Domestic Animal**, v.47 (Suppl. 4), p.31–37, 2012.
- 13
- 14 FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R. Manipulação de
- 15 oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In:_____. GONÇALVES, P.B.D.;
- 16 FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2^a ed.,
- 17 São Paulo: Roca, 2008.
- 18
- 19 FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SANTOS, R.R. Manipulação de Oócitos
- 20 Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais: MOIFOPA. In: OLIVEIRA, M.E.F.;
- 21 TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**,
- 22 1^a ed., São Paulo: MedVet, p. 330, 2013.
- 23
- 24 FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W. A comparison of dissected follicle numbers and
- 25 follicle counts on the ovarian surface for the evaluation of ovarian follicular populations in
- 26 *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.46(3-4), p.179-86, 1997.
- 27
- 28 FERRO, B.F. **Iminohistoquímica, Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e**
- 29 **Tanatológica**. Instituto Politécnico de Lisboa, 2013.
- 30
- 31 FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of**
- 32 **Reproduction**, v.50, p.225–232, 1994.

- 1 GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. **Laboratory**
2 **production of cattle embryos**. Cambridge: Raven Press, p. 4349, 1994.
3
- 4 HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: Hafez ESE,
5 Hafez, B. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, p. 69–82, 2004.
6
- 7 HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International**
8 **Review of Cytology**, v.124, p.43–101, 1991.
9
- 10 HSUEH, A.J.W.; BILING, H; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled
11 apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v.15, p.707-724, 1994.
12
- 13 HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN
14 HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries.
15 **Veterinary Quarterly**, v.2(16), p.78–80, 1994.
16
- 17 IETS. Statistics and Data Retrieval Committee Report. In: Embryo Transfer Newsletter.
18 **International Embryo Transfer Society**, v.31 (4), 2013.
19
- 20 IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.;
21 WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND,
22 J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and
23 follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.
24
- 25 IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.;
26 LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
27 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
28 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–
29 1695, 2007.
30
- 31 IRELAND, J.J.; ZIELAK, A.E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA,
32 A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P.G.; SMITH, G.W.; LONERGAN,
33 P.; EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicularo

- 1 estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in
2 cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.
- 3
- 4 JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., TILLY, J.L. Germline stem cells
5 and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.
- 6
- 7 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**.
8 11ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.528, 2008.
- 9
- 10 LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios
11 esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35(4), p.472–
12 482, 2011.
- 13
- 14 McMORMICK, D., HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen.
15 **Histopathology**, v. 21, n. 6, p. 591-4, 1992.
- 16
- 17 MEER, S.; GALPIN, J.S.; ALTINI, M.; COLEMAN, H. AND ALI, H. Proliferating cell
18 nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. **Oral Surgery, Oral**
19 **Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.95, p.213-221, 2003.
- 20
- 21 MOROTTI, F.; SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; MORITZ, Y.;
22 MARCANTONIO, T.N.; SENEDA, M.M. Follicular dynamics in Nelore females (Bos
23 indicus) with high or low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v.11, p.352,
24 2014. (abstract).
- 25
- 26 MOSSA F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
27 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
28 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
29 p.2355–2361, 2012.
- 30
- 31 MYOUNG, H.; KIM, M.J.; LEE, J.H.; OK, Y.J.; PAENG, J.Y.; YUN, P.Y. Correlation of
32 proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral
33 squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients.
34 **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 1005–1010, 2006

- 1 OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating Cell Nuclear Antigen Marks
2 the Initiation of Follicular Growth in the Rat. **Biology of Reproduction**, v.53, p.295-301,
3 1995.
- 4
- 5 PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M.A. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of
6 frequency of occurrence. **Theriogenology**, v.69, p. 977–982, 2008.
- 7
- 8 PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann Biol Anim Biochim**
9 **Biophys [journal]**, v.16(3), p.271–278, 1976.
- 10
- 11 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
12 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
13 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
14 donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
- 15
- 16 RAJKOVIC, A.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M. M. Follicular development: mouse, sheep,
17 and human models. In: Neill, J.D. Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**, 3th ed.,
18 St. Louis: Academic Press, 2006.
- 19
- 20 REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.;
21 CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique &**
22 **Fertilité**, v.38, p.395–397, 2010.
- 23
- 24 RODGERS, R.J., LAVRANOS, T.C., VAN WEZEL, I.L., IRVING-RODGERS, H.F.
25 Development of the ovarian follicular epithelium. *Molecular and Cellular*
26 **Endocrinology**, v.151, p.171-179, 1999.
- 27
- 28 RUBIN, K.C.P., RIGO, A.G., SCHROEDER, R.V., SILVA, R.C.P, MARQUES, M.O.,
29 SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para
30 obtenção in vivo de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004
31 (Resumo).
- 32
- 33 RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Anatomical Bibliography**, v. 24, p.77–92, 1983.

- 1 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**,
2 v.1822, p.1896–1912, 2012.
- 3
- 4 SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.;
5 MARCANTONIO, T.; MARINHO, L.S.R.; THASMO, R.L.O.; KOETZ, J.R.C.; CINTRA,
6 D.M.L.; SENEDA, M.M. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa
7 contagem de foliculos antrais: resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.40,
8 p.422, 2012 (abstract).
- 9
- 10 SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; BARREIROS, T.R.R.; BLASCHI, W.;
11 MOROTTI, F.; SILVA, C.B.; MORAES, F.L.Z.; GIUDICISSI, D.P.L.; SENEDA, M.M.
12 Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and
13 low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v.10, p.451, 2013. (abstract).
- 14
- 15 SANTOS, R.G.; SOTO, M.A.B.; LOURENÇO, R.X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.;
16 ACCORSI, M.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y.F. Aspiration folicular
17 em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. **Anais do Congresso**
18 **Brasileiro de Reprodução Animal**, v.16, p. 79, 2005.
- 19
- 20 SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER,
21 T.A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and
22 packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early
23 follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890-3900, 2008.
- 24
- 25 SILVA, J.R.V. Growth factors in goat ovaries and the role of activina-A in the development of
26 early-staged follicles. **Phd Thesis. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine**,
27 p.142, 2005.
- 28
- 29 SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries.
30 **Animal Reproduction**, v.8, n.3/4, p.58-67, 2011.
- 31
- 32 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
33 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
34 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In

- 1 Vivo – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
2 **Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014.
- 3
- 4 SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro.
5 **Reproduction**, v.123, p.185–202, 2002.
- 6
- 7 STROUD, B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm
8 animals. **IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report**. 2012.
- 9
- 10 STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key
11 factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, v.107, p. 1127–1140,
12 2011.
- 13
- 14 SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral
15 follicles in the ovary of the mare. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v.5, p.33–35,
16 2008.
- 17
- 18 TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in
19 mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*).
20 **Journals of Reproduction & Fertility**, v.81, p.137–147, 1987.
- 21
- 22 TELFER, E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; JOO THONG, K. A two-step serum-free
23 culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the
24 presence of activin. **Human Reproduction**, v.23(5), p.1151–1158, 2008.
- 25
- 26 THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but
27 significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report
28 from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society**
29 **Newsletter**, p.12-19, 2004.
- 30
- 31 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
32 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–1751,
33 2005.

- 1 VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario.
- 2 **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 p.915–24, 2007.
- 3
- 4 WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In: Knobil, E.; Neill, J. **The Physiology of**
- 5 **Reproduction**, New York: Raven Press, p.69–101, 1988.

3. HIPÓTESE

- A taxa de proliferação celular nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular em fêmeas nelore (*Bos indicus*) é influenciada pela contagem de folículos antrais (CFA).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a influência da população folicular antral sobre a proliferação celular nas fases de desenvolvimento folicular em fêmeas Nelore (*Bos indicus*).

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificar a proliferação celular nas diferentes categorias foliculares em fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta vs. média vs. baixa contagem de folículos antrais a partir da utilização do antígeno nuclear de proliferação celular.

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FOLÍCULOS OVARIANOS EM FÊMEAS *BOS INDICUS* COM DIFERENTES CONTAGENS DE FOLÍCULOS ANTRAIIS

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O objetivo do estudo foi comparar as taxas de proliferação celular dos folículos entre fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta, média e baixa contagem de folículos antrais. Ovários (n=336) obtidos aos pares em abatedouro local e transportados até o laboratório. A classificação dos grupos foi definida utilizando a média \pm desvio padrão, em G-Alta (≥ 92 folículos), G-Média (46-76 folículos) e G-Baixa (≤ 31 folículos). A partir desta classificação, a atividade proliferativa folicular foi estabelecida em três grupos experimentais (fêmeas de alta CFA n=5; média n=5 e baixa n=5). Estes ovários foram seccionados em fragmentos de 1 x 1 x 0,3cm, fixados em solução de formalina tamponada a 10%, processados e submetidas à avaliação imunohistoquímica para o anticorpo anti-PCNA. A imunoposição para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) foi detectada em todos os estágios do desenvolvimento folicular. Foram encontrados 1.688 folículos imunomarcados, dos quais 1.388 eram primordiais, 197 primários, 29 secundários e 74 antrais. Os dados de imunomarcção do PCNA de cada grupo foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene) e posteriormente comparados usando Teste de Fisher ($p \leq 0,05$). Os grupos de G-Média e G-Baixa expressaram maior proliferação celular no estágio antral do desenvolvimento folicular. Em contraponto, o grupo G-Alta obteve maior imunomarcção em folículos primordiais, com decréscimo até a fase de folículo antral ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos através de avaliação imunohistoquímica sugerem que a taxa de proliferação celular nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular em fêmeas nelore (*Bos indicus*) é influenciada pela contagem de folículos antrais (CFA).

Palavras-chave: Bovino, desenvolvimento folicular, imunohistoquímica e ovários.

1. INTRODUÇÃO

A produção de animais geneticamente superiores remete a maior eficiência reprodutiva, no qual proporciona a ascensão de biotecnologias com âmbito mundial, como a produção *in vitro* de embriões e a Ovum Pick Up (OPU). Estas biotecnologias contam com fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*), visto que são capazes de proporcionar uma maior recuperação de oócitos por seção de OPU e resulta em maior produção de embriões que fêmeas *Bos taurus* (Thibier et al., 2004; Pontes et al., 2011; Viana; Camargo, 2007; Batista et al., 2014). Tal fato ocorre devido a quantidade de folicúlos presentes nos ovários de vacas Nelore, possuindo maior contagem de folicúlos antrais (CFA).

Alguns estudos propõem elucidar a influência da contagem de folicúlos antrais (CFA) na fertilidade de fêmeas bovinas. Sabe-se que o número de folicúlos antrais observados em ondas foliculares de um mesmo indivíduo, é repetível (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007, 2008, 2009, 2011; Silva-Santos et al., 2014a,b), isto permite a classificação reprodutiva destas a partir de um único exame ultrassonográfico.

Mossa et al. (2012) sugeriram na raça Holandesa (*Bos taurus*) a infertilidade de vacas com baixa CFA. Além disso, relataram correlação positiva entre alta CFA como um indicador para eficiência reprodutiva. Neste contexto, estudos recentes demonstraram padrões distintos para zebuínos. Deste modo, fêmeas *Bos indicus* (Nelore) e fêmeas Braford (*Taurus indicus*) parecem não apresentar melhor desempenho reprodutivo associado à alta CFA (Santos et al., 2012, 2013; Morotti et al, 2014; Santos et al.,2016). Entretanto, ocorre maior taxa de crescimento folicular e também maiores diâmetros foliculares em *Indicus-taurus* (Santos et al, 2012) e *Indicus* (Morotti et al, 2014) em fêmeas com baixa CFA. Assim, folicúlos dominantes com diâmetros maiores foram descritos em fêmeas da raça Nelore com baixa CFA (Morotti et al, 2015; dados não publicados).

Até o momento, não há uma explicação estabelecida para tal contexto e o assunto segue em investigação. Uma estratégia para melhorar a compreensão dos parâmetros reprodutivos de fêmeas *Bos indicus*, é investigar a contribuição da proliferação celular no padrão de crescimento folicular. Assim como, correlacionar esta atividade proliferativa com a CFA. Este pode ser um ponto crucial para desvendar as particularidades envolvidas na reprodução de fêmeas *Bos indicus* ainda incompreendidos.

No entanto, são escassas as investigações sobre a correlação da CFA com fatores envolvidos na ativação, proliferação celular, crescimento e desenvolvimento dos

1 folículos ovarianos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a proliferação celular em fêmeas
2 Nelore (*Bos indicus*) de alta, média e baixa CFA, através da técnica imunohistoquímica.

3

4 2. MATERIAL E MÉTODOS

5

6 2.1 *Obtenção dos ovários*

7

8 Ovarios de vacas Nelores cíclicas (com presença de corpo lúteo), entre 72-
9 96 meses e escore de condição corporal 4 - 4,5 (escala de 1 a 5), foram coletados em
10 abatedouro local distante 20 km do laboratório. Os pares de ovários foram acondicionados
11 separadamente por animal e transportados em caixa térmica com solução salina NaCl 0,9% a
12 30°C até o laboratório.

13

14 2.2 *Determinação da contagem de folículos antrais*

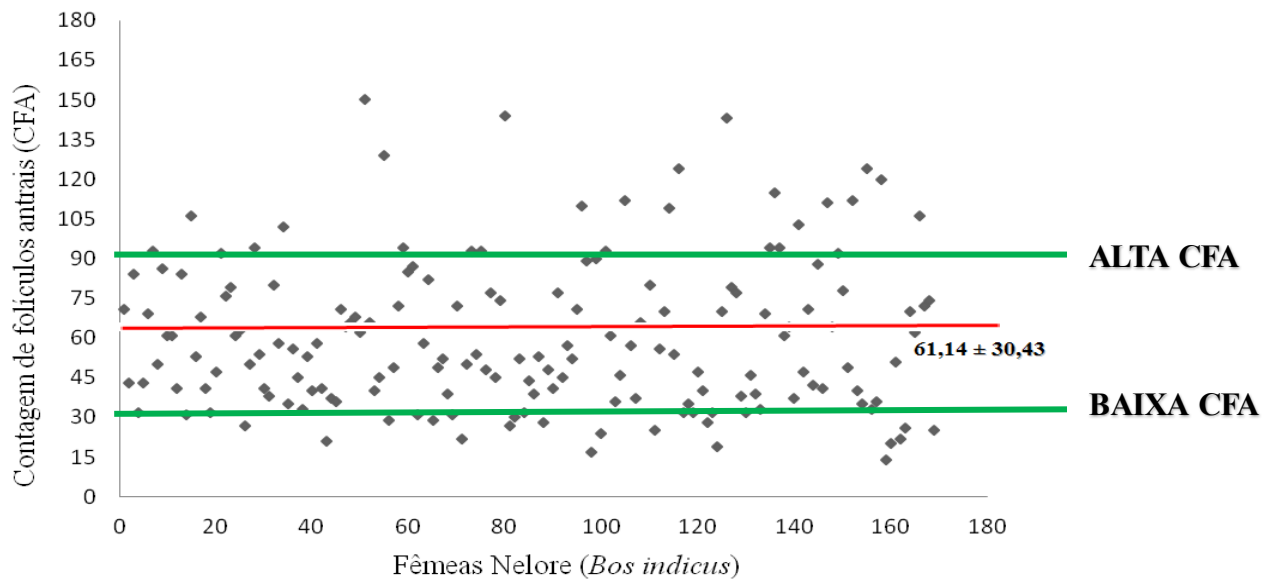
15

16 Para classificação e distribuição das fêmeas (n=168) nos três grupos
17 experimentais (alta, média e baixa contagem de folículos antrais), realizou-se um experimento
18 prévio. A média da população de folículos antrais foi obtida a partir da contagem dos
19 folículos antrais (CFA) visíveis na superfície dos pares dos ovários (Rosa et al, 2015). A CFA
20 de todos os animais foi realizada por um mesmo operador previamente treinado.

21

22 A distribuição das fêmeas de acordo com a média da CFA está demonstrada
23 na figura 5. A média geral da quantificação da população de folículos antrais encontrada foi
24 de $61,14 \pm 30,43$, e com base nessa média, os animais foram classificados em três grupos: G-
Alta, G-Média e G-Baixa CFA.

Figura 5. Distribuição da média referente à contagem visual de foliculos antrais dos pares de ovários.



O grupo de alta CFA foi obtido pela média da população folicular com desvio padrão +1 (G-Alta: ≥ 92 foliculos antrais). O grupo de baixa CFA, pela média da população folicular com desvio padrão -1 (G-Baixa: ≤ 31 foliculos antrais). O grupo de média CFA foi obtido pela média da população folicular com desvio padrão $\pm \frac{1}{2}$ (G-Média: 46–76 foliculos antrais), possibilitando um intervalo de maior confiabilidade entre os grupos. A média da PFA encontrada dentro dos grupos foi de 25, 60 e 113 foliculos antrais para os grupos G-Baixa, G-Média e G-Alta, respectivamente.

2.3 Processamento histológico

Após a classificação e distribuição dos grupos, foi realizado o experimento para a detecção da proliferação celular nos foliculos ovarianos. Para tanto foram utilizadas 15 fêmeas, distribuídas entre os grupos G-Alta (n=5), G-Média (n=5) e G-Baixa (n=5), apenas um ovário do par de cada fêmea foi utilizado no processamento histológico, de acordo com a ausência de corpo lúteo e foliculo pré-ovulatório. Os ovários selecionados foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 1 x 1 x 0,3 cm e em seguida fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 8 horas. Posteriormente estes fragmentos permaneceram em álcool 70% por 24 horas, após desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e incluídos em blocos para cortes histológicos. Os cortes seriados com 5 μ m foram seccionados em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha) para montagem das lâminas. Estas foram processadas para histologia clássica com

1 coloração PAS e Hematoxilina. A partir desta avaliação, os melhores fragmentos foram
2 direcionados para avaliação imunohistoquímica da atividade proliferativa, utilizando o
3 Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA).

4 5 2.4 Imunohistoquímica

6
7 A proliferação celular foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica, a
8 partir da detecção específica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Os
9 anticorpos utilizados foram: anticorpo primário; *mouse* anti-PCNA (anticorpo monoclonal
10 clone PC10, Novex®, diluição 1:100), e anticorpo secundário: goat anti-mouse, Invitrogen,
11 diluição 1:100). Os protocolos, controles positivos e negativos foram utilizados de acordo
12 com as instruções do fabricante.

13 Os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados e submetidos à
14 recuperação antigênica, em solução de tris-EDTA Tween (pH 9,0) com incubação em panela
15 de pressão elétrica por aproximadamente 9 minutos. Na sequência, os cortes foram
16 submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes
17 (3%) por 30 minutos, e bloqueio de reação inespecífica com a solução bloqueadora de
18 membrana (invitrogen TM) por 30 min. Assim, foram incubados com anticorpo primário
19 anti-PCNA “overnight” (18 horas), a 4°C sobre um rocker para agitação constante do
20 anticorpo sobre o corte.

21 Após a incubação, o anticorpo secundário foi conjugado por 30 minutos e,
22 em seguida, a reação foi revelada pelo substrato Diaminobenzidina (DAB) na cor castanha em
23 aproximadamente cinco minutos. Posteriormente, o material foi contra corado pela
24 Hematoxilina de Harris, desidratado e as lâminas foram montadas. Estas foram então
25 analisadas em microscópio de luz (Nikon®, Tokyo, Japan) nas objetivas de 20 e 40X.

26 Os folículos foram classificados conforme o estágio de desenvolvimento, de
27 acordo com o formato, o número e a quantidade de células da granulosa (CG), como segue:
28 primordial, oócito envolto por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso;
29 primário, com uma camada completa de células da granulosa cuboides; secundário, com duas
30 ou mais camadas de células germinativas cuboides; antral, com três ou mais camadas de
31 células da granulosa cuboides ao redor do oócito e presença do antro (Silva-Buttkus et al.,
32 2008). A avaliação da imunomarcação para o antígeno PCNA foi qualitativa, ou seja, pela
33 presença ou ausência de imunomarcação.

34

2.5 Análise estatística

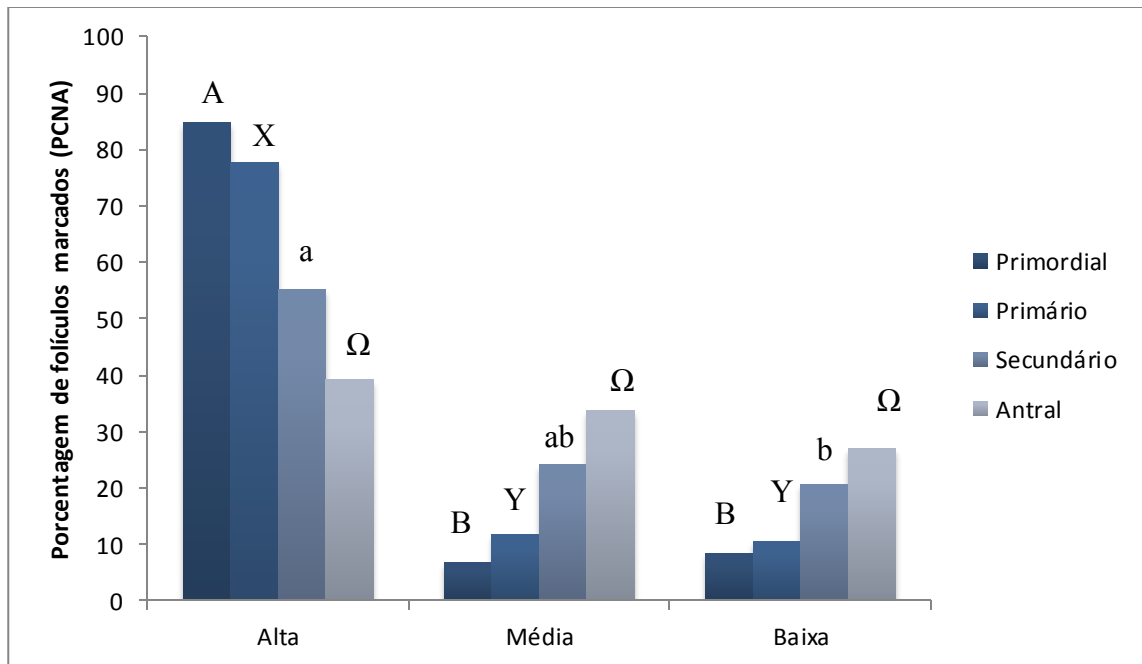
Os dados de imunomarcção de cada grupo animal (G-Alta, G-Média e G-Baixa) para o antígeno PCNA, foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levenne) e posteriormente comparados usando Teste de Fisher. Todas as análises foram realizadas com o software Action 2.3 (Campinas, SP, Brasil) considerando-se valores significativos de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Avaliou-se a marcação imunohistoquímica de 1.688 folículos totais, dos quais 1.388 eram primordiais, 197 primários, 29 secundários e 74 antrais obtidos nos grupos de fêmeas *Bos indicus* (G-Alta, G-Média e G-Baixa CFA). A marcação observada nos folículos primordiais e primários restringiu-se ao citoplasma e núcleo, já nos secundários e antrais, além deste padrão havia marcação das células da granulosa e teca. Os grupos de G-Média e G-Baixa apresentaram menor taxa de proliferação nos estágios primordiais e primários do desenvolvimento folicular. No decorrer do crescimento folicular, esta taxa aumentou progressivamente. Em contraponto, o grupo G-Alta obteve imunomarcção para proliferação celular maior em folículos primordiais, com decréscimo até a fase de folículo antral.

Nos três grupos avaliados, a distribuição dos folículos ovarianos imunomarcados para PCNA apresentou um padrão crescente nos G-Média e G-Baixa durante o desenvolvimento folicular. No entanto o G-Alta apresentou um padrão decrescente. Em relação à quantidade de folículos ovarianos imunomarcados, o grupo de alta CFA se destacou quanto ao número de primordiais, primários e secundários comparados aos grupos de média e baixa. A quantidade de folículos antrais imunomarcados não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 6).

1 **Figura 6.** Porcentagem de folículos imunomarcados por categoria folicular (primordial,
 2 primordial, secundário e antral) em relação aos grupos de fêmeas *Bos indicus* de alta, média e
 3 baixa CFA.
 4



5
 6 Diferença estatística entre a mesma categoria folicular nos diferentes grupos animais ($p \leq 0,05$).

7 Em relação às classificações foliculares de cada grupo animal, os folículos
 8 primordiais apresentaram maior porcentagem de marcação para PCNA. No grupo G-alta não
 9 houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre folículos primários, secundários e antrais. O grupo
 10 de média só apresentou diferença estatística entre folículos primordiais e secundários ($p \leq$
 11 $0,05$). Os animais de baixa CFA assim como os de alta, demonstraram diferença estatística
 12 dos folículos primordiais, em relação às demais categorias foliculares (Tabela 1, $p \leq 0,05$).

13

14 **Tabela 1.** Porcentagem de folículos imunomarcados (primordiais, primários, secundários e
 15 antrais) em relação ao total de marcados de cada grupo animal (alta, média e baixa CFA).

16

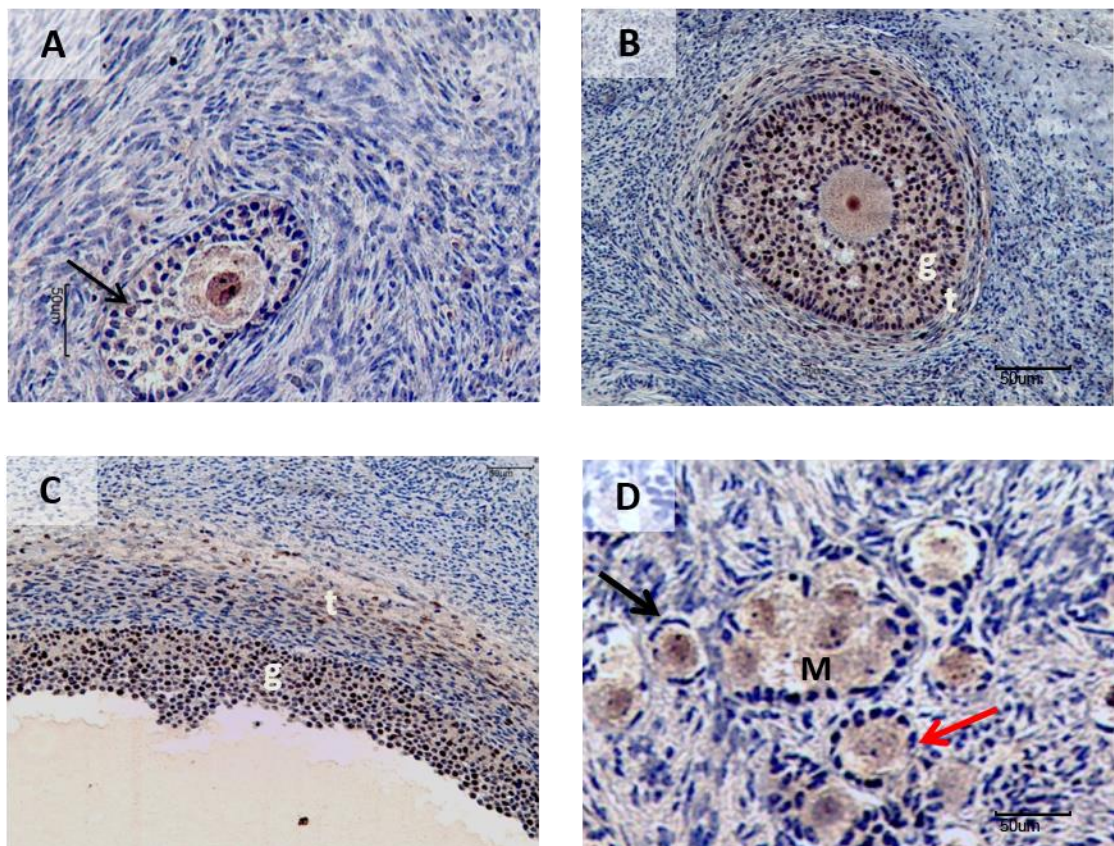
Folículo	G-Alta % (n)	G-Média % (n)	G- Baixa % (n)
Primordial	85,6 (1177) ^a	63 (94) ^a	71,3 (117) ^a
Primário	11,1 (153) ^b	15,5 (23) ^{ab}	12,8 (21) ^b
Secundário	1,2 (16) ^b	4,7 (7) ^b	3,7 (6) ^b
Antral	2,1 (29) ^b	16,8 (25) ^{ab}	12,2 (20) ^b
Total	100 (1375)	100 (149)	100 (164)

17 ^{a,b} Diferença significativa entre linhas ($p \leq 0,05$).

1 Durante avaliação imunohistoquímica dos folículos secundários, observou-
 2 se um padrão na marcação de PCNA entre as células da granulosa e teca nos três grupos
 3 animais. A medida que estes folículos apresentavam poucas camadas de células da granulosa
 4 e em média 10 células imunomarcadas, havia ausência de marcação das células da teca. Já os
 5 folículos secundários que possuíam mais camadas de células da granulosa, além de mais
 6 células imunomarcadas demonstravam também camadas da teca com marcação para
 7 proliferação celular. Nestes, o número de células imunomarcadas na camada da granulosa
 8 mostrava-se numericamente maior quando comparadas as células marcadas na teca (Figura 7
 9 A e B). Esta correlação também foi observada em folículos antrais (Figura 7 C).

10

11 **Figura 7.** Ilustração da técnica imunohistoquímica de folículos ovarianos marcados na cor
 12 castanha para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A- imunomarcação de
 13 núcleo, citoplasma e células da granulosa (seta) em folículo secundário inicial. B-
 14 Imunomarcação de núcleo, citoplasma, células da granulosa (g) e teca (t) em folículo
 15 secundário. C- Camadas da granulosa (g) e teca (t) de folículo antral. D- Imunomarcação de
 16 núcleo e citoplasma de folículos primordiais (seta preta), primários (seta vermelha) e
 17 imunomarcação de multioócitos (M).
 18

19
20

21 O presente estudo constatou a presença de 33 folículos multioócitos
 22 contendo de dois até sete oócitos inclusos em um único folículo (Figura 7 D). Estes foram

1 encontrados apenas em animais do grupo de alta CFA. Os folículos multioócitos encontrados
2 pertenciam às categorias de folicular tais como primordiais (n=28), primários (n=4) e
3 secundários (n=1). Todos apresentaram marcação para proliferação celular, nos quais os
4 multioócitos primordiais e primários obtiveram apenas o citoplasma e núcleo marcados. Este
5 padrão também foi constatado em folículos destas categorias com apenas um oócito. O
6 multioócito secundário foi o único folículo multioócito que não apresentou imunomarcação
7 para proliferação celular.

9 4. DISCUSSÃO

10
11 Nossa investigação constatou que fêmeas Nelore (*Bos indicus*) de média e
12 baixa CFA expressaram maior proliferação celular nas fases finais do desenvolvimento
13 folicular. Este é o primeiro estudo que avalia a correlação entre proliferação celular e
14 população folicular antral em fêmeas Nelore (*Bos indicus*).

15 A identificação de fêmeas com alta, média e baixa quantidade de folículos
16 antrais baseada na CFA é possível devido repetibilidade do número de folículos antrais nas
17 ondas foliculares de um mesmo indivíduo (Ireland et al., 2007, 2008; Mossa et al., 2010;
18 Silva-Santos et al., 2014). Nosso estudo utilizou este princípio de repetibilidade para
19 classificação dos grupos experimentais.

20 Estudos aplicados com fêmeas zebuínas de baixa CFA constataram
21 melhores índices reprodutivos comparadas às de média e alta CFA. E ainda demonstraram
22 maior taxa de crescimento, e maiores diâmetros foliculares em fêmeas *Indicus-taurus* e
23 *indicus* com baixa CFA (Santos et al, 2012; Morotti et al, 2014). Nestas fêmeas os folículos
24 dominantes obtiveram maiores diâmetros em relação aos demais grupos (Morotti et al., 2015;
25 dados não publicados). Tal fato influencia na taxa de concepção em programas de IATF
26 (Perry, 2007; Meneghetti et al., 2009; Pfeifer et al., 2015). Os resultados obtidos no presente
27 trabalho corroboram com a possibilidade de vacas de baixa CFA apresentarem maior
28 potencial e desenvolvimento folicular antral baseado na imunomarcação por PCNA.

29 Fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta CFA não apresentaram performance
30 reprodutiva superior em relação às de média e baixa (Santos et al., 2012, 2013; 2013; Morotti
31 et al., 2014; Santos et al., 2016). Nossa investigação sugere que este resultado pode estar
32 correlacionado com a baixa atividade proliferativa nos estágios finais de desenvolvimento
33 folicular nestas fêmeas.

1 Em contraponto assume-se que vacas *taurus* apresentam correlação positiva
2 entre alta CFA e indicadores de eficiência reprodutiva. Já fêmeas *taurus* de baixa CFA
3 possuem características de baixa fertilidade, tais como menor taxa de prenhes ao final da
4 estação reprodutiva (Mossa et al., 2012). Até o presente momento não há trabalhos que
5 avaliem a proliferação celular correlacionada com a população folicular em fêmeas *Bos taurus*.

6 Estudo realizado na espécie suína, investigou a imunomarcção da
7 proliferação celular em células da granulosa e teca, de modo que não obtiveram diferença
8 entre a marcação destes tipos celulares (Sun et al., 2012). No presente trabalho constatamos
9 que as categorias dos folículos secundários e antrais também apresentaram marcação para
10 PCNA destas células. Porém os folículos secundários iniciais apresentaram nenhuma ou
11 pouca marcação das células da teca. À medida que os folículos secundários adquirem mais
12 camadas imunomarcadas de células da granulosa, o mesmo ocorre nas células da teca. Este
13 padrão de imunomarcção ocorreu em todos os grupos animais, e também foi percebido em
14 folículos antrais.

15 Um importante achado deste estudo foi a presença de folículos multioócitos
16 somente em fêmeas adultas de alta CFA, tal fato, não condiz com o encontrado por Silva-
17 Santos et al. (2014). Estes relataram a prevalência de 50% de multioócitos em fêmeas *Bos*
18 *indicus* de baixa CFA. Sabe-se ainda, que folículos multioócitos são encontrados em maior
19 quantidade em fetos, novilhas e vacas *Bos taurus* quando comparados *Bos indicus* da mesma
20 categoria (Silva-Santos et al., 2011). Geralmente são descritos em fetos durante a fase de
21 formação de folículos primordiais (Diniz et al, 2005; Silva-Santos et al, 2011). No entanto, a
22 prevalência destes folículos em ovários de animais adultos também está de acordo com relatos
23 prévios para outras espécies (Al-Muffi et al., 1988; Reynaud et al., 2010; Silva-Santos et al.,
24 2011; Silva-Santos et al., 2014).

25 Reynaud et al. (2009), encontraram alta incidência de folículos multioócitos
26 em estágios finais de desenvolvimento em cadelas adultas. Estes autores afirmam que, apesar
27 dos fatores envolvidos na seleção do oócito não estarem esclarecidos, possivelmente um ou
28 mais oócitos contidos nestas estruturas possam ter a capacidade de ser fecundado (Reynaud et
29 al., 2009). Neste trabalho, obtivemos apenas multioócitos nas fases pré-antrais do
30 desenvolvimento folicular.

31 No entanto, Stankiewicz et al. (2009) demonstraram em experimentos com
32 suínos, a possibilidade de folículos multioócitos se desenvolverem progressivamente até os
33 estágios finais de maturação, ou seja, folículos pré-ovulatórios. Além disso, realizaram a
34 fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos multioócitos, e o desenvolvimento destes

1 até a fase de blastocisto, ressaltando a possibilidade de obtenção de embriões *in vitro* a partir
2 de oócitos contidos em foliculos multioócitos. Até o momento, não é bem compreendido o
3 papel dos foliculos multioócitos nos ovários de fêmeas bovinas adultas, embora tenham sido
4 relatados nesta espécie (Silva-Santos et al., 2011; Silva-Santos et al., 2014).

5 Neste estudo a imunomarcção de núcleo e citoplasma dos foliculos
6 multioócitos foi positiva em foliculos primordiais e primários, corroborando com a maior
7 atividade proliferativa nestes estágios foliculares nas fêmeas de alta CFA, e demonstrando que
8 estes foliculos possuem atividade proliferativa. Confirmando a capacidade da marcação
9 imunohistoquímica por PCNA em demonstrar atividade proliferativa nos diferentes estágios
10 de desenvolvimento dos foliculos ovarianos.

11 A imunomarcção pelo PCNA foi demonstrada em diferentes fases
12 foliculares de ratos, bovinos e suínos, no entanto, esta marcação não foi verificada em
13 foliculos primordiais das respectivas espécies (Oktay et al., 1995; Wandji et al., 1996;
14 Tománek; Chronowska, 2006). Tal fato pode ser correlacionado à fase de mitose das células
15 da granulosa, cuja expressão do antígeno é drasticamente reduzida. Em contraponto, nosso
16 estudo obteve atividade proliferativa positiva para PCNA do estágio primordial até antral, em
17 todos os grupos animais (G-Alta, G-Média e G-Baixa CFA). Tal fato pode ser explicado pela
18 atividade presente nas fases de reparação e replicação do DNA durante a divisão celular
19 (Myoung et al., 2006; Strzalka; Ziemienowicz, 2011).

20 Em conclusão os animais de média e baixa CFA apresentaram maior
21 marcação para proliferação celular no estágio folicular antral, em relação aos animais de alta
22 CFA que apresentaram maior marcação para proliferação celular no estágio primordial. Deste
23 modo, podemos sugerir que a proliferação celular durante a foliculogênese de fêmeas Nelore
24 (*Bos indicus*), pode ser influenciada pela população de foliculos antrais presentes nos ovários.

1 REFERÊNCIAS

2

3 AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÉS, J. Ph. Oocyte size and
4 intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journals of Reproduction &**
5 **Fertility**, v.82, p.15-25, 1988.

6

7 BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.;
8 DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S.
9 Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos
10 indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**,
11 v.49, p.448-452, 2014.

12

13 BROER S.L.; MOL, B.W.J.; HENDRIKS, D.; BROEKMANS, F.J.M. The role of
14 antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle
15 count. **Fertility and Sterility**, v.91, n.3, p.705-714, 2009.

16

17 DINIZ, E.G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Morphological development of
18 the ovaries in embryos and fetuses of Nelore breed. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
19 **Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.70-76, 2005.

20

21 HENDRIKS, D.J., MOL, B.W., BANCSI, L.F., TE VELDE, E.R., BROEKMANS, F.J.
22 Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro
23 fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level.
24 **Fertility and Sterility**, v.83, p. 291-301, 2005.

25

26 IRELAND, J.J., SMITH, G.W., SCHEETZA, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGERA, J.K.,
27 IRELAND, J.L.H., MOSSA, F., LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Does size matter in
28 females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian
29 function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and
30 causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and**
31 **Development**, v.23, p.1-14, 2011.

32

33 IRELAND, J.L.H., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., THEMEN, A.P.N., WARD,
34 F., LONERGAN, P., SMITH, G.W., PEREZ, G.I., EVANS, A.C.O., IRELAND, J.J. Antral

- 1 follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in
2 ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.
- 3
- 4 IRELAND, J.J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., SMITH, G.W.,
5 LONERGAN, P., EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
6 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
7 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687–
8 1695, 2007.
- 9
- 10 IRELAND, J.J., ZIELAK, A.E., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J., BETTEGOWDA,
11 A., SCHEETZ, D., WALSH, S., MOSSA, F., KNIGHT, P.G., SMITH, G.W., LONERGAN,
12 P., EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular
13 oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality
14 in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.954–964, 2009.
- 15
- 16 MENEGHETTI, M.; SA FILHO, O.G; PERES, R.F; LAMB, G.C; VASCONCELOS, J.L.
17 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I:
18 basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189, 2009.
- 19
- 20 MOROTTI, F.; SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; MORITZ, Y.;
21 MARCANTONIO, T.; SENEDA, M.M. Follicular dynamics in Nelore females (*Bos indicus*)
22 with high or low numbers of antral follicles. **Animal Reproduction**, v.11, p.352, 2014.
23 (abstract).
- 24
- 25 MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.;
26 LONERGAN, P.; EVANS, A.C.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in antral
27 follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in
28 cattle. **Reproduction**, v.140, p.713–720, 2010.
- 29
- 30 MOSSA F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.
31 SMITH, G.W. IRELAND, J.J.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm
32 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
33 p.2355–2361, 2012.
- 34

- 1 OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the
2 initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction**, v.53, p.295-301, 1995.
3
- 4 PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W.
5 Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers.
6 **Journal of Animal Science**, v.85, p.684–689, 2007.
7
- 8 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
9 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
10 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
11 donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
12
- 13 REYNAUD, K.; VIARIS, D.E.; LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.;
14 CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte
15 chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**,
16 v.72, p.1120–1131, 2009.
17
- 18 REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.;
19 CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique &**
20 **Fertilité**, v.38, p.395–397, 2010.
- 21 ROSA, C.O., MARINHO, L.S.R., LUNARDELLI, P.A., MACHADO, F.Z., GONZALEZ,
22 S.M., ROSA, P.R.A., CESARO, M.P. BUENO, J.V.R., BORDIGNON, V., SENEDA,
23 M.M. In vitro embryo development and gene expression in granulosa and cumulus cells from
24 *Bos indicus* cows with different numbers of antral follicles. **Anim. Reprod.**, v.12, n.3, p.762,
25 2015.
26
- 27 SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.;
28 MARCANTONIO, T.N.; MARINHO, L.S.R.; THASMO, R.L.O.; KOETZ, J.R.C.; CINTRA,
29 D.M.L.; SENEDA, M.M. 2012. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa
30 contagem de foliculos antrais: resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.40,
31 p.422, 2012 (abstract).
32

- 1 SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; BARREIROS, T.R.R.; BLASCHI, W.;
2 MOROTTI, F.; SILVA, C.B.; MORAES, F.L.Z.; GIUDICISSI, D.P.L.; SENEDA, M.M.
3 Conception rates following FTAI of Nelore cows (*Bos indicus*) with high, intermediate and
4 low numbers of antral follicles. *Animal Reproduction*, v.10, p.451, 2013. (abstract).
5
- 6 SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; BARREIROS, T.R.R.; MOROTTI, F.;
7 SANCHES, B,V; MORAES, F.L.Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M.M. High numbers of antral
8 follicles are positively associated with **in vitro** embryo production but not the conception rate
9 for FTAI in Nelore cattle. *Animal Reproduction Science*, v.165, p. 17–21, 2016.
10
- 11 SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER,
12 T.A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and
13 packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early
14 follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890-3900, 2008.
15
- 16 SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE,
17 E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the
18 population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus*
19 females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.
20
- 21 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.;
22 SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C.
23 M.; SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In
24 Vivo – of *Bos indicus-taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in**
25 **Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014.
26
- 27 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO,
28 L.S.; MARCANTONIO T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, D.C.M.;
29 SENEDA, M.M.. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of
30 *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic**
31 **Animals**, v.49, p.228-232, 2014a.
32
- 33 SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; SANTOS, G.M.C.; MOROTTI, F.;
34 MARCANTONIO, T.N.; SENEDA, M.M. Comparison of antral and pre-antral ovarian

- 1 follicle populations between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* cows with high or low antral
2 follicles counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.48-51, 2014b.
- 3 STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.; UDALA, J. A Study on the Occurrence of
4 Polyovular Follicles in Porcine Ovaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone
5 Concentrations, Quality of Oocytes and their in vitro Fertilization. **Anatomia, Histologia,**
6 **Embryologia**, v.38, p.233–239, 2009.
- 7
- 8 THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but
9 significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report
10 from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society**
11 **Newsletter**, p.12-19, 2004.
- 12
- 13 TOMÁNEK, M., CHRONOWSKA, E. Immunohistochemical localization of proliferating
14 cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44,
15 n.4, p.269-274, 2006.
- 16
- 17 WANDJI, S.A.; SRSEI, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, V. Initiation in vitro of
18 growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.
- 19
- 20 VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario.
21 **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 p.915–24, 2007.
- 22

6. CONCLUSÕES

- A proliferação celular pode ser influenciada pela contagem de folículos antrais, durante as diferentes fases foliculares de fêmeas Nelore (*Bos indicus*).
- Animais de média e baixa CFA apresentaram maior taxa de proliferação celular no estágio folicular antral, em relação aos animais de alta CFA.