



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NAYARA TISSOT LUNARDON

**COMPARAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIIS E DA FREQUÊNCIA DE FOLÍCULOS
MULTIOÓCITOS DE CADELAS PRÉ-PÚBERES E ADULTAS
DE PEQUENO E MÉDIO PORTE**

NAYARA TISSOT LUNARDON

**COMPARAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIIS E DA FREQUÊNCIA DE FOLÍCULOS
MULTIOÓCITOS DE CADELAS PRÉ-PÚBERES E ADULTAS
DE PEQUENO E MÉDIO PORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina .

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L961c Lunardon, Nayara Tissot.

Comparação da população de folículos pré-antrais e da frequência de folículos multioócitos de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte / Nayara Tissot Lunardon. – Londrina, 2013.
49f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos pré-antrais – Teses. 3. Folículos ovarianos – Teses. 4. Oócito – Teses. 5. Cão – Reprodução – Teses. 6. Histologia veterinária – Teses. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

NAYARA TISSOT LUNARDON

**COMPARAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS E
DA FREQUÊNCIA DE FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS DE CADELAS
PRÉ-PÚBERES E ADULTAS DE PEQUENO E MÉDIO PORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina .

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a Maria Denise Lopes
UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins
UEL – Londrina – PR

Londrina; 10 de Maio de 2013.

Dedico este trabalho a meus pais
Solange e Eduardo e ao meu marido
Fernando que sempre me apoiaram
para que chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente a Deus por me dar força, paciência e sabedoria para encarar mais esta conquista na minha vida, por me dar uma família e amigos maravilhosos que estão sempre ao meu lado.

Aos meus pais Eduardo e Solange, pela dedicação, sacrifício, incentivo e amor em todos os anos de minha vida. Agradeço por serem os maiores e melhores incentivadores da minha carreira, quando nas horas em que pensei em desistir, estavam ao meu lado me dando força e conselhos. Agradeço por serem grandes exemplos de profissionais dedicados e me inspirar a sempre ir mais longe. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Bruno e Alex por me proporcionar momentos ótimos na companhia deles, agradeço por viver em meio a esses dois grandes homens que influenciaram muito na minha personalidade. Se não fossem nossas brigas e conversas, talvez não fosse quem sou hoje. Às minhas cunhadas Daniele e Jéssica também agradeço pela companhia e incentivo de vocês. À minha sobrinha mais linda, Ana Roza, simplesmente por existir e fazer a minha vida mais feliz.

Ao meu amado marido Fernando por estar sempre ao meu lado nas maluquices que invento fazer, que aguenta o meu mau humor de muitos dias, que me ama e demonstra isso sempre no seu abraço confortante. Meu lindo te amo!

A minha orientadora Prof^a. Maria Isabel Mello Martins, ou simplesmente “Bel”. Tudo isso não seria possível sem a sua colaboração, sem seu apoio, seu conhecimento e sua paciência. Sei que fui uma orientada muito displicente e que lhe dei muitas preocupações, mas você sempre presente me fazia acordar e correr atrás das coisas necessárias, se não fosse por você talvez tivesse desistido. Muito Obrigada!

Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda por ceder seu laboratório, seus materiais e muitos dos seus orientados para auxiliar no meu projeto e por fazer parte da minha banca e poder colaborar neste trabalho. Por sua atenção, meu obrigado.

As minhas colegas da pós-graduação, a mestranda Rebeca Justino, e a doutora Kátia Silva-Santos por me ajudarem no meu projeto, me auxiliarem na coleta de material, no processamento do material, nas tabelas e nas análises estatísticas. Sem vocês não sei o que seria de mim. Kátia você foi a pessoa impar para que meu projeto caminhasse, pois você foi mais que colega, você foi minha professora, minha conselheira e companheira. Rebeca, sem você não sei o que iria fazer para processar todos aqueles ovários. Obrigada meninas!

Ao estagiário Gabriel Dessunti Torres e a futura mestranda Marília pelo auxílio no laboratório. Obrigada pelo tempo dispensado.

A professora Carmem Hilst, por permitir a minha presença no projeto de controle de natalidade, onde consegui a maioria das minhas amostras.

A professora Ana Paula, por ceder seu laboratório para processamento histológico.

A Dr^a. Livia Aires Lisboa e a Dr^a Fabiana Ferreira de Souza por aceitar fazer parte da minha banca de qualificação e poder me auxiliar com seus conhecimentos.

A Dr^a. Maria Denise Lopes, por fazer parte da minha banca e auxiliar e colaborar para a melhora do trabalho.

Aos meus eternos amigos, Cárita, Paola, Kessy, Mary, Mari B, Fábio, Batata, Thadeu, Dinho, Maira e seus “agregados”, por serem meus amigos e amigos do peito, ou amigos de toda a vida. Amo vocês!!!

A toda minha família, tios, primos, vô Renee e aos meus sogros Alaíde e Doro pelo apoio.

E por fim, não menos importante, mas necessário, ao Theo e Fred, meus “filhos caninos” que sempre me fazem companhia, inclusive quando escrevi estes agradecimentos.

OBRIGADA!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

LUNARDON, Nayara Tissot. **Comparação da população de folículos pré-antrais e da frequência de folículos multioócitos de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte**. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Informações sobre a distribuição e a quantificação dos folículos ovarianos pré-antrais em fêmeas caninas são escassas na literatura, principalmente em cadelas pré-púberes. A comparação entre cadelas pré-púberes e adultas irá contribuir para a escolha da fêmea no uso de biotecnologias da reprodução. Os objetivos deste trabalho foram, comparar a população de folículos pré-antrais entre cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte, comparando a população entre os ovários direito e esquerdo e a frequência de folículos multioócitos em cadelas pré-púberes e adultas. Oitenta ovários provenientes de quarenta fêmeas caninas, divididas em quatro grupos (pré-púberes ,n= 40 e adultas, n=40, de pequeno e médio porte), foram obtidos por ovariectomia eletiva. Após a cirurgia, os ovários foram imersos em fixador Bouin para processamento histológico. Posteriormente os ovários foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e seccionados seriadamente em intervalos de 5 µm. A cada 70 secções histológicas foi confeccionada uma lâmina com o tecido e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. O número de folículos pré-antrais foi estimado pela contagem dos folículos em cada secção usando o núcleo do oócito como marcador e fator de correção. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos, considerando significativo $p \leq 0,05$. Os resultados demonstraram que fêmeas pré-púberes de médio porte apresentaram maior quantidade de folículos pré-antrais comparado aos outros grupos. A população de folículos pré-antrais apresentou grande variação entre fêmeas da mesma idade e entre os grupos. A mediana \pm erro padrão foi de 51.611 \pm 18.577 em pré-púberes de pequeno porte, 143.562 \pm 21.718 em pré-púberes de médio porte, 49.546 \pm 10.951 em adultas de pequeno porte e 28.090 \pm 15.705 em adultas de médio porte. Observou-se diferenças na estimativa da população de folículos pré-antrais de cadelas entre os ovários direito e esquerdo. Entre as fêmeas avaliadas 55% apresentaram folículos multioócitos e a maioria continha duas a três células germinativas, mas ocasionalmente, folículos com até 12 oócitos foram observados. Os resultados demonstraram que as fêmeas pré-púberes de médio porte apresentaram uma quantidade maior de folículos multioócitos comparado com as adultas de médio porte. Concluindo, a utilização de ovários de cadelas pré-púberes proporcionará um número maior de folículos pré-antrais para a utilização em biotecnias da reprodução assistida; a utilização de somente um dos ovários para estimar a população de folículos pré-antrais em cadelas pode subestimar ou superestimar os resultados; e as fêmeas pré-púberes independente do porte, apresentaram maior incidência de MOF's (14/20) do que as fêmeas adultas (8/20).

Palavras-chave: Estimativa folicular. Multioócitos. Folículos pré-antrais. Pré-púbere. Adulta. Fêmeas caninas.

LUNARDON, Nayara Tissot. **Comparison of the population of preantral follicles and frequency of multioccytes follicles from prepubertal and adult bitches small and medium-sized.** 2013. 49p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Information about the distribution and quantification of ovarian preantral follicles in female dogs are scarce in the literature, especially in prepubertal bitches. The comparison between prepubertal and adult bitches and will contribute to the choice in use of reproductive biotechnologies. The objectives of this study were to compare the preantral follicles population bitches between prepubertal and adult small and medium-sized, comparing the population between the right and left ovaries and frequency of multioccytes follicles in prepubertal and adult bitches. Eighty four ovaries from bitches were divided into four groups (prepubertal n=40, adult n = 40, small and medium-sized), were obtained by elective ovariohysterectomy. After surgery, the ovaries were immersed in Bouin's fixative for histological processing. Thereafter the ovaries were dehydrated in alcohol, diaphanized in xylene, embedded in paraffin and sectioned at 5µm. Every 70 histologic sections were made with a blade tissue and stained with periodic acid-Schiff (PAS) and hematoxylin. The number of preantral follicles was estimated by counting the follicles in each section using the oocyte nucleus as a marker and correction factor. The preantral follicles were classified according to their stage of development. We used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for comparison between groups, $P \leq 0.05$ considered significant. The results showed that females prepubescent midsize showed higher amount of preantral follicles compared to other groups. The population of preantral follicles showed large variations between individuals of the same age and between groups. The median \pm standard error of preantral follicles was 51611 ± 18577 in small prepubertal bitches, 143562 ± 21718 in midsize prepubertal bitches, 49546 ± 10951 in small adult females and 28090 ± 15705 for adult midsize females. There were differences in the estimated of preantral follicles population from right and left ovaries of bitches. Among females evaluated 55% had follicles multioccytes and most contained two to three germ cells, but occasionally up to 12 follicles with oocytes were observed. The results showed that prepubertal bitches midsize showed a greater amount of follicles multioccytes compared with adult midrange. Concluding, the use of the ovaries of prepubertal bitches will provide a greater number of preantral follicles for use in assisted reproduction biotecnias, the use of only one of the ovaries to estimate population of primordial follicles in bitch can change or mask the results, and prepubertal bitches had a higher incidence of MOF's (14/20) than adult females (8/20), regardless of size.

Key words: Follicles estimation. Multioccyte. Preantral. Prepubertal. Adult. Female dogs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1.Folículo Primordial; 2. Folículo Primário; 3. Folículo Secundário; 4. Folículo Terciário; 5. Folículo de Graaf. (Adaptado de Rodgers et al, 1999)20

ARTIGO 1

- Figura 1** – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário evidenciando folículos primordiais em um aumento de 400x. Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina31
- Figura 2** – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário de cadela evidenciando folículos primários, em um aumento de 400x. Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina.....32
- Figura 3** – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário de cadela evidenciando folículo secundário, em um aumento de 400x. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina32
- Figura 4** – Gráfico demonstrando a variação no número de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas pré-púberes de pequeno porte (A), pré-púberes de médio porte (B).....34
- Figura 5** – Gráficos demonstrando a variação no número de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas adultas de pequeno porte (A),adultas de médio porte (B)35

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** – Mediana \pm EP do número de folículos pré-antrais nos ovários de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.....33
- Tabela 2** – Mediana \pm EP do número de folículos pré-antrais dos ovários (direito e esquerdo) de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte33

ARTIGO 2

- Tabela 1** – Mediana \pm EP do número de folículos multioócitos pré-antrais de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EP	Erro Padrão
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteotrófico
MOF	Folículo multioócito
PAS	Ácido Periódico-reativo de Schiff

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 HIPÓTESES	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 FIOLOGIA REPRODUTIVA DAS CADELAS.....	17
4.2 OVÁRIO	17
4.3 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	17
4.4 CLASSIFICAÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.....	19
4.5 OVULAÇÃO	20
4.6 FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS.....	21
4.7 POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA.....	22
4.8 REFERÊNCIAS	22
5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	26
5.1 ARTIGO 1	26
5.1.1 Introdução	27
5.1.2 Material E Métodos	28
5.1.2.1 Princípios éticos.....	28
5.1.2.2 Animais e obtenção dos ovários	28
5.1.2.3 Processamento histológico	29
5.1.2.4 Classificação dos folículos ovarianos pré-antrais	29
5.1.2.5 Quantificação folicular.....	30
5.1.2.6 Análise estatística	30
5.1.3 Resultados	30
5.1.4 Discussão.....	35
5.1.5 Referências	38

5.2 ARTIGO 2.....	40
5.2.1 Introdução	41
5.2.2 Material E Métodos	41
5.2.2.1 Princípios éticos.....	41
5.2.2.2 Animais e obtenção dos ovários	42
5.2.2.3 Processamento histológico	42
5.2.2.4 Classificação dos folículos ovarianos pré-antrais	43
5.2.2.5 Quantificação folicular.....	43
5.2.2.6 Análise estatística	43
5.2.3 Resultados E Discussão.....	43
5.2.4 Referências	46
6 DISCUSSÃO GERAL.....	47
CONCLUSÃO	49

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população *pet* no mundo aumentou significativamente nos últimos anos (MARTHE, 2009), conseqüentemente aumentou o interesse pela reprodução e biotecnologias das espécies envolvidas. O conhecimento sobre a população de folículos ovarianos é de suma importância na utilização das biotecnologias da reprodução, pois a grande maioria dos oócitos usados nessas técnicas são folículos pré-antrais. Os embriões produzidos *in vitro* podem ser utilizados em programas de multiplicação animal, melhoramento do potencial reprodutivo, do valor zootécnico e também evitar o risco de extinção de algumas espécies. O sucesso em procedimentos como a maturação *in vitro*, a fertilização de oócitos *in vitro*, a transferência de embriões e a criopreservação de folículos, depende do conhecimento da fisiologia, das características morfofuncionais e da população folicular ovariana.

Estudos envolvendo características reprodutivas de caninos ainda não foram totalmente elucidados na literatura. As cadelas domésticas são importantes, pois servem de modelo experimental tanto para humanos como para canídeos silvestres ameaçados de extinção, pois os cães domésticos possuem uma similaridade na fisiologia reprodutiva com os canídeos silvestres além do que, há uma escassez e dificuldade de manejo desses animais. No Brasil, seis espécies da ordem Carnívora se encontram próximas da ameaça de extinção (IUCN, 2011).

Sabe-se que a população de folículos ovarianos pré-antrais podem ser afetadas por fatores genéticos, pela idade (ERICKSON, 1966), pela raça (CAHILL; MÁULEON, 1980) e níveis hormonais (PETERS, 1976). A comparação da população de folículos pré-antrais poderá trazer informações sobre a oogênese e folículogênese dessa espécie, e verificar se há um decréscimo de folículos, através de mecanismo apoptótico e pela senilidade, durante a vida reprodutiva dessas fêmeas, como descrito por Waldeyer em 1870, ou se há uma folículogênese pós-natal com um possível envolvimento de células-tronco capazes de gerar células de outro tecido, como demonstrado por Johnson et al. (2005) e Zhou (2009) em camundongos. Também promoverá informações para a escolha do perfil da fêmea no uso de biotecnologias da reprodução, proporcionando mais eficiência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a população de folículos pré-antrais e frequência de folículos multioócitos entre fêmeas caninas de diferentes idades e portes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a população de folículos pré-antrais entre cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte, por histologia clássica.

Verificar se há diferença no número de folículos pré-antrais entre os ovários direito e esquerdo.

Comparar a frequência de folículos multioócitos entre cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.

3 HIPÓTESES

Existe diferença entre o número de folículos ovarianos pré-antrais entre cadelas de diferentes portes e diferentes idades pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.

Há diferenças entre a população folicular pré-antral do ovário direito e do esquerdo de cadelas domésticas.

Existe variação entre o número de folículos multioócitarios entre as cadelas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FISILOGIA REPRODUTIVA DAS CADELAS

As cadelas domésticas são monoéstricas, apresentam um ou dois ciclos estrais por ano com um período de quiescência até o surgimento de um novo ciclo e apresentam uma fase luteínica semelhante entre as fêmeas gestantes e não gestantes, o que não é observado em outras espécies (CONCANNON et al., 1989).

O ciclo estral apresenta quatro fases funcionais, sendo proestro, que indica a fase folicular, o estro que é a fase de receptividade sexual e luteínica, diestro, que também é uma fase luteínica e o anestro que é a fase de quiescência (ETTINGER, 1992). O ciclo varia conforme as raças e idades, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (FELDMAN; NELSON, 2004).

4.2 OVÁRIO

O ovário é o órgão reprodutivo das fêmeas responsável pela produção de oócitos e hormônios esteroidais. Sua formação completa se dá em torno de 40 dias no desenvolvimento fetal em cadela (SERAFIM et al., 2009). Possui estrutura ovalada, localizada à altura das 3ª e 4ª vértebras lombares, caudal ao rim. Seu tamanho depende do tamanho corporal da fêmea, idade e fase do ciclo estral, mas em média possui 20mm de comprimento e 15mm de largura aproximadamente (RODRIGUES; RODRIGUES, 2003).

Os folículos estão localizados na córtex do ovário, e os vasos sanguíneos, vasos linfáticos e os nervos localizam-se na porção medula ovariana (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

4.3 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

De acordo com Hafez (2004) o processo de formação, crescimento e maturação folicular pode ser definido como foliculogênese, iniciando com folículos primordiais até os folículos de Graff, ou folículos pré-ovulatórios.

As cadelas possuem particularidades quando se refere a oogênese e foliculogênese, diferentemente de outras espécies a oogênese e foliculogênese

das cadelas podem ocorrer até dois meses após o nascimento (FAYER-HOSKEN et al., 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário as células germinativas migram do saco vitelínico para as cristas gonadais e passam a ser chamadas de oôgonias e iniciam a mitose. As oôgonias são circundadas por células somáticas e diferenciam-se em oócitos, que circundados por uma única camada pavimentosa de células da granulosa, constituem em folículos primordiais (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Na maioria dos mamíferos nesta fase o oócito inicia a meiose e a interrompe na fase de diplóteno da prófase I e permanece nesta fase até o seu recrutamento, que ocorre no início da puberdade. Após serem recrutados os oócitos evoluem na meiose e são ovulados em metáfase II (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005).

Nas cadelas, mesmo após o recrutamento os oócitos se mantêm, na fase de diplóteno da prófase I, chamado de vesícula germinativa, e sua maturação, ou seja, a continuação da meiose, só acontecerá no oviduto (BUCCIONE et al., 1990).

O mecanismo de recrutamento dos folículos não está completamente esclarecido, porém acreditasse que seja controlado por fatores intraovarianos independentemente da ação de gonadotrofinas, como revisado por Seneda et al, 2008.

O declínio progressivo do número de oócitos ao longo da vida pós-natal devido a mecanismos apoptóticos e de senilidade foi descrito por Waldeyer em 1870, e foi aceito por décadas, entretanto Johson et al. (2004 e 2005), em camundongos, apresentaram evidências demonstrando a continuidade da oôgenese e foliculogênese no período pós-natal pela atuação de células-tronco.

Em 2009 Zhou et al. corroboraram para os experimentos de Johson et al. (2004 e 2005), comprovando a capacidade regenerativa ao utilizar o transplante de células-tronco da linhagem germinativa em camundongas que foram quimicamente esterilizadas. Zhou et al (2009) também demonstraram que o transplante de células-tronco nas fêmeas estéries proporcionou descendentes em cerca de 80% dos animais submetidos.

4.4 CLASSIFICAÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS

O folículo é constituído por um oócito circundado por células da granulosa e tem como função produção e liberação de hormônios esteróides e também a função gametogênica. Os folículos podem ser divididos de acordo com seu grau de evolução em folículos pré-antrais, caracterizados pela ausência da cavidade antral e folículos antrais, cuja característica é a presença da cavidade antral (FIGUEIREDO et al., 2002).

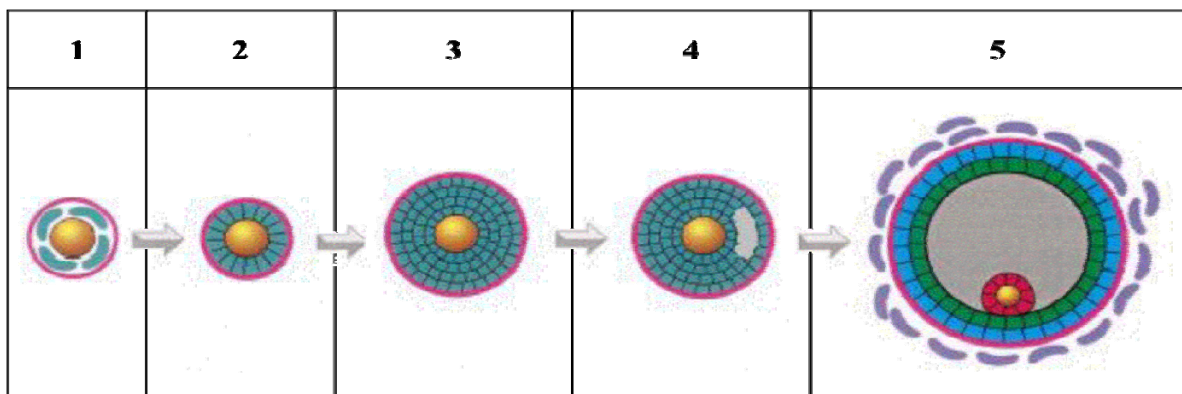
Os folículos foram classificados de acordo com o número de camadas de células da granulosa ao redor do oócito por Mandl e Zuckerman em 1951, assim surgindo a proposta de classificação dos folículos. Hulshof et al. (1994) classificaram os folículos pré-antrais em primordiais, primários e secundários, onde os primordiais e primários são distinguidos por diferenças morfológicas, sendo que os folículos primordiais apresentam um oócito rodeado por uma única camada de 4 a 8 células da granulosa achatadas; os primários apresentam oócito rodeado por uma única camada de 11 a 12 células da granulosa cuboidais e; os secundários mais de uma camada de células da granulosa cuboidais, conforme a representação na Figura 1.

Nas cadelas os folículos primordiais foram identificados com 17 a 54 dias após o nascimento com o oócito em estágio de vesícula germinativa (TELFER et al., 2000). Os folículos primordiais apresentam uma única camada de células pavimentosas da granulosa e possuem cerca de 25µm de diâmetro (RODRIGUES;RODRIGUES, 2003). Quando as células do folículo primordial passam de pavimentosas a cuboides, estes evoluem para folículos primários, há o início da formação da zona pelúcida que permanece por todo o desenvolvimento folicular. Durante a diferenciação alguns folículos possuem tanto células pavimentosas quanto cuboides, sendo chamados de folículos de transição (VAN DEN HURK et al.,1997).

Quando os folículos primários atingem um estágio com mais de duas camadas de células da granulosa cuboidais são denominados secundários (FAYER-HOSKEN, 2000). Nesta fase a a caracterização da zona pelúcida e das primeiras células da teca (BANKS, 1992). A ação gonadotrófica já pode ser detectada, iniciando os efeitos do FSH e LH (VAN DEN HURK et al, 2000).

O desenvolvimento de um folículo terciário resulta da atividade secretora das células da granulosa, surgindo um fluido, que forma uma cavidade, chamada de antro (BANKS, 1992). A cavidade antral é constituída pela transudação do líquido folicular, originado do plasma periférico, através da membrana basal (HAFEZ, 2004). Na fase final de desenvolvimento do folículo antral, o oócito permanece envolvido por uma camada de células da granulosa denominadas *cumulus oophoros* e tem como função fornecer nutrientes aos oócitos durante seu crescimento (SWENSON, 2006). Os folículos terciários evoluem para folículos de Graaf também são chamados de folículos pré-ovulatórios ou maduros. Tanto o folículo terciário como o pré-ovulatório tem um ação gonadotrófica intensa.

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1. Folículo Primordial; 2. Folículo Primário; 3. Folículo Secundário; 4. Folículo Terciário; 5. Folículo de Graaf.



Fonte: Adaptado de Rodgers et. al (1999)

4.5 OVULAÇÃO

A ovulação ocorre aproximadamente dois dias após o pico de LH (hormônio luteotrófico), no início do estro, e como os oócitos liberados estão imaturos necessitam de pelo menos 48 horas para completar a maturação meiótica, característica única da espécie canina. O oócito pode permanecer entre 8,5 a 9 dias no oviduto (HOLST; PHEMISTER, 1971).

Depois da ruptura da parede ovariana, ocorre uma hemorragia formando um coágulo, que é uma estrutura transitória, denominado corpo hemorrágico. Após um acúmulo de um pigmento lipídico amarelo (luteína) e outros lipídeos, o corpo hemorrágico evolui para a formação do corpo lúteo (BANKS, 1992), que será o responsável pela produção de progesterona na fase de diestro.

O oócito sai do estágio de vesícula germinativa e passa para o estágio de metáfase II, ocorrendo alterações não somente no núcleo, mas também no citoplasma, de maneira independente, para poder ser fecundado e estar apto para desenvolver como embrião (DEW, 2001, RODRIGUES; RODRIGUES, 2003). Nas cadelas são necessários dois eventos para que a maturação ocorra, um pico de LH para induzir a maturação e outro pico de LH aproximadamente três dias após a ovulação para induzir a retomada da meiose (VIARIS DE LESEGNO et. al., 2008).

4.6 FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS

Na maioria dos casos, os folículos de mamíferos contêm somente um oócito por folículo, mas podem existir folículos com mais de um oócito, que são chamados de folículos multioócitos (MOF) ou poliovulares.

A existência de MOFs poderia ser explicada de acordo com três suposições: a divisão de um oócito, a fusão de vários folículos diferentes ou a não separação de vários conjuntos de oogônias nos cordões sexuais. Esta última hipótese é a considerada mais provável, pois não se trata de um fenômeno patológico, mas de um “polimorfismo” devido ao desequilíbrio entre o número de células somáticas e germinativas (REYNAUD, 2010).

A frequência de folículos multioócitos é espécie e indivíduo dependente. Em gambá, na rata, porca e cabra, os folículos multioócitos são mais comuns nos ovários das fêmeas mais jovens. Nas cadelas, alguns autores demonstraram que no início de suas vidas reprodutivas apresentam maior número de folículos multioócitos do que animais idosos, embora outros não relatam diferença no número de folículos multioócitos entre fêmeas jovens e adultas (PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008; STOKER et al., 2008). Em mulheres e camundongas os multioócitos são raros, enquanto nas cadelas representam cerca de 14% da população folicular. A qualidade desses folículos contendo mais de um oócito é muito heterogênea (REYNAUD, 2012).

4.7 POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA

A população folicular ovariana é bem distinta em relação as espécies, como por exemplo: 37.853 folículos pré-antrais em gatas (CARRIJO JUNIOR, 2009), 79.600 a 270.000 em mulheres (GOUGEON;CHAINY, 1987) e 9.940 a 30.900 em macacas (MILLER et al., 1999). Ainda dentro de uma mesma espécie pode variar com relação a raça (CAHILL et al., 1979), genética (ERICKSON, 1966), idade, níveis hormonais (PETERS, 1976) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON et al, 1976).

4.8 REFERÊNCIAS

- BANKS, W.J. Sistema Reprodutor Feminino. In: **Histologia Veterinária Aplicada**, 2ª edição. Manole LTDA, São Paulo, p. 565-575, 1992.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interation between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547. 1990.
- CAHILL, L.P.; MAULÉON P. A study of the populations of primordial and small follicules in the sheep. **Journal Reproduction. Fertility** V.61 p. 201-206. 1981.
- CARRIJO JR, O. A.; MARINHO, A. P. S.; CAMPOS, A. A.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 152–160, 2010.
- CONCANNON, P.W., MACCANN, J.P., TEMPLE, M.. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal Reproduction Fertility Suppl** , n.39 , p.3-25, 1989.
- DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56 f. Thesis (Master of sciences) – University of Georgia, 2001.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science** v.25 p. 800–805.1966.
- ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE,R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v.15, p.555-560, 1976.
- ENGLAND, G.C.W.; HEWITT, D.A. Follicular growth and ovulation in dogs. In: **EVSSAR Annual Symposium**. Lyon , p. 51. 1999.
- ETTINGER S.J. **TRATADO DE MEDICINA INTERNA VETERINÁRIA**. 3ª edição. São Paulo: Manole, 1992. v.4,p.1857-1869.
- FAYRER-HOSKEN, R.A.; DOOKWAH, H.D.; BRANDON C.I. Immunocontrol in dogs. **Animal Reproduction Science** v. 60–61, p. 365–373.2000

FELDMAN, E., NELSON, R. Ovarian Cycle and Vaginal Citology. In: FELDMAN, E., NELSON, R. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3ª edição. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2004. p.752-776.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, p. 227-256, 2002.

GOUGEON, A., CHAINY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.433-442, 1987.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed., São Paulo, Manole, 513p. 2004.

HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog. Preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 771-779, 1971.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.2, p.78-80, 1994.

IUCN, UCN. Red List of Threatened Species. Version 2011.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**. 428:145-50.2004.

JOHNSON, J., BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.; ADAMS, G.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.; TILLY, J.; CORTES, M.; FORKERT, R. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. **Cell**. v.15, p.122:303, 2005.

MANDL, A.M.; ZUCKERMAN, S. The relation of age to numbers of oocytes. **J.Endocrinol.**, v.7, p.190-193, 1951.

MARTHE, M.A. **A humanização dos bichos de estimação**. Disponível em: < <http://veja.abril.com.br/220709/nossa-familia-animal-p-084.shtml> >. Acesso em: 23, janeiro, 2013.

MILLER P. B., CHARLENSTON J. S., BATTAGLIA D. E., KLEIN N. A. & SOULES M. R. Morphometrics analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: symmetry and relationship with age. **Biology of Reproduction** v. 61, p. 553-556, 1999.

NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 137p. 2003.

PAYAN-CARREIRA R., PIRES M.A.. Multiocyte follicles in domestic dogs: a survey of frequency of occurrence. **Theriogenology**; 69:977-982, 2008

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v.16, p.271-278, 1976.

REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S. ; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 38, p. 395–397.2010

REYNAUD, K. Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of the oocyte and embryo in the dog. **International Symposium on Canine and Feline Reproduction**. v. 7, p 211-212. 2012.

RODRIGUES, B.A. RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v.60, p.59-66, 2003.

SENEDA, M.M.; GODMANN, M.; MURPHY, B.D., KIMMINS, S.; BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. **Reproduction** v. 135, p. 829-838. 2008.

SERAFIM, M.K.B., ARAÚJO, V.R. SILVA G.M.. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**.v.74,p.749-755.2010.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**. p.3:147-60.2005.

STOKER C., BELDOMÉNICO P.M., BOSQUIAZZO V.L., ZAYAS M.A., REY F., RODRÍGUEZ H., MUÑOZ-DE-TORO M., LUQUE E.H.. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in Caiman latirostris. **General and Comparative Endocrinology**; 156:603- 612, 2008.

SWENSON, M.J. Dukes: **Fisiologia dos animais domésticos**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.p.946.2006

TELFER, E.E. et al. *In vitro* development of oocyte from porcine and bovine primary follicles. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.163, p.117-123, 2000.

VAN DEN HURK R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.

VAN DEN HURK, T.; ABIR, R.; TELFER, E.E.; BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 25, p. 15-20, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology** v.63 p.1717-51 .2005

VIARIS LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p.115-125,2008.

VIARIS LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p.626-639, 2008.

WALDEYER, W. Eierstock und Ei, **Leipzig**, Engelmann.1870.

ZHOU K, YUAN Z, YANG Z, LUO H, SIM K, ZHOU L, XING J, SHI I, YU Q, ZHANG Y et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from ovaries. **Nat Cell Biol** v. 11, p 631-636. 2009.

5.1 ARTIGO 1

ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM CADELAS PRÉ-PÚBERES E ADULTAS

Estimativa da população de folículos pré-antrais em cadelas pré-púberes e adultas

N.T. Lunardon^a; K.C. Silva-Santos^a; R.C. Justino^a; G.T.Dissunti^a; M.M.Seneda^a,
M.I.M. Martins^{a,b}

Este artigo científico esta de acordo com as normas para a publicação na **Theriogenology**, de acordo com o site:

<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

RESUMO: Os objetivos deste trabalho foram estimar a população de folículos pré-antrais entre cadelas pré-púberes e adultas de pequeno (até 10 kg) e médio porte (10 a 20 kg) e comparar a população entre os ovários direito e esquerdo. Oitenta ovários provenientes de 40 cadelas saudáveis, divididas em 4 grupos (pré-púberes de pequeno porte, n= 10, pré-púberes médio porte, n=10 e adultas pequeno porte, n=10, adultas de médio porte, n=10), foram obtidos por ovariohisterectomia eletiva. Imediatamente após a cirurgia, os ovários foram imersos em fixador Bouin para processamento histológico. Posteriormente, foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e seccionados seriadamente em intervalos de 5 µm. A cada 70 secções histológicas foi confeccionada uma lâmina com o tecido e corada com ácido periódico de Schiff e hematoxilina. O número de folículos pré-antrais foi estimado pela contagem dos folículos em cada secção usando o núcleo do oócito como marcador e fator de correção. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos, considerando significativo $p \leq 0,05$. Os resultados demonstraram que fêmeas pré-púberes de médio porte ($\pm 12,7\text{Kg}$) apresentaram 2.709.337 de folículos pré-antrais, número superior aos demais grupos. A população de folículos pré-antrais apresentou grande variação de folículos pré-antrais entre indivíduos da mesma idade e entre os grupos. Observou-se diferenças na estimativa da população de folículos pré-antrais entre os grupos de cadelas dos ovários direito (156.446 ± 35.010 , 42.373 ± 14.174 , $p=0,02$) mas não houve diferença no esquerdo. Houve variação significativa entre a população folicular pré-antral em cadelas pré-púberes

^a Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil.

^b Correspondência autor: Maria Isabel Mello Martins. Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil. imartins@uel.br. Telefone: 55 43 3371 4559, FAX: 55 43 3371 4063.

de médio porte e também entre ovários esquerdo e direito em todas as categorias estudadas.

Palavras-chave: Folículos pré-antrais. Pré-púbere. Adulta. Cadelas. Ovário direito. Ovário esquerdo.

5.1.1 Introdução

Os conhecimentos científicos acerca da aplicação de biotécnicas na reprodução animais da população *pet* têm aumentado devido ao grande interesse na criação dessas espécies no mundo. Estes conhecimentos proporcionarão benefício direto para os cães de estimação, e também canídeos silvestres ameaçados de extinção. [1]

O rendimento da maturação *in vitro* de oócitos caninos oriundos de folículos antrais é baixo tornando limitada a aplicabilidade de biotécnicas da reprodução que pode ser solucionado através da utilização de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, visto que estão em maior quantidade e presentes em todas as fases da vida reprodutiva do animal [2].

As biotécnicas aplicadas à reprodução tais como a produção *in vitro* de embriões (PIV), clonagem e transgenia com a manipulação de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), compreendem três fases: obtenção dos FOPAs, conservação (criopreservação ou resfriamento) e cultivo *in vitro*. A obtenção *in vitro* de FOPA possibilita o incremento e a padronização dessas biotecnologias, fornecendo um grande número de oócitos provenientes de um mesmo animal [3].

Devido às particularidades inerentes a fisiologia canina, as biotécnicas aplicadas à reprodução da espécie canina permanecem não padronizadas dentro de processos de maturação, obtenção e seleção dos oócitos [4].

Para que as biotécnicas sejam aprimoradas na espécie canina, há a necessidade de maiores conhecimentos sobre a população folicular ovariana, principalmente a população folicular pré-antral, por abrigar maior quantidade de oócitos utilizados nas biotecnologias.

Sabe-se que a qualidade morfológica de oócitos de fêmeas doadoras é melhor quando estão com idade entre um e três anos, independente da fase do ciclo estral e que os eventos hormonais pré-ovulatórios não afetam a

subsequente maturação *in vitro* de oócitos de alta qualidade [4], porém não há nenhuma informação relacionada ao porte das cadelas.

Para a obtenção *in vitro* de FOPA, utilizam-se duas técnicas: o “slicing” que consiste em fatiar o ovário utilizando uma lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura [5] e “digestão ovariana”, técnica em que os ovários são colocados em solução enzimática a 37°C, por uma hora, quando então o produto da digestão é filtrado e colocado em solução para lavagem [6]. Entretanto nenhum autor citou se há diferença entre os ovários, direito e esquerdo, na quantidade de folículos ovarianos obtidos nessas técnicas.

O objetivo deste trabalho foi estimar e comparar a população de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte, além de comparar a população entre os ovários direito e esquerdo.

5.1.2 Material E Métodos

5.1.2.1 Princípios éticos

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais e sob a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina – PR, registrado sob processo nº CEUA 24531.2011, aprovado em reunião realizada em 2012.

5.1.2.2 Animais e obtenção dos ovários

Foram utilizados 80 ovários provenientes de 40 cadelas, colhidos de dois grupos, fêmeas pré-púberes e adultas, após a ovariohisterectomia eletiva [7]. Os grupos foram separados em dois subgrupos de acordo com o peso, porte pequeno ($5,7 \pm 0,4$) e médio ($12,3 \pm 0,6$).

Dados em (mediana \pm erro padrão), as cadelas pré-púberes de pequeno porte apresentaram ($8 \pm 0,4$) meses de idade, e ($5,5 \pm 0,6$) kg de peso, já as pré-púberes de médio porte estavam com ($8 \pm 0,6$) meses de idade e ($11,4 \pm 0,9$) kg. As cadelas adultas de pequeno porte possuíam ($2 \pm 0,4$) anos de idade e ($6,4 \pm 0,4$) kg, enquanto as adultas de médio porte estavam com ($2 \pm 0,3$) anos de idade e ($12,7 \pm 0,7$) kg.

Os ovários foram identificados como direito e esquerdo e os resultados foram analisados individualmente e após a somatória em cada grupo.

As cadelas ovariohisterectomizadas foram oriundas de um programa de controle de natalidade. As fêmeas não apresentavam patologia uterina e ovariana detectável macroscopicamente.

5.1.2.3 Processamento histológico

Imediatamente após a obtenção dos ovários, os mesmos foram lavados em solução salina 0,9%. Ato contínuo, as peças foram imersas em fixador Bouin, preparado com 0,9% ácido pícrico, 9% formaldeído e 5% ácido acético [8], durante 24 horas, a 4°C e transferidas para o álcool 70% até o processamento histológico.

Os ovários foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. Posteriormente, infiltrados e embebidos em parafina. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura [9] em micrótomo rotativo (RM2255, Leica®, Leica Biosystems Melbourne Pty LTD, Wetzlar, Alemanha). A cada 70° secção histológica, o tecido foi colocado em lâmina de vidro e corado com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina para análise estrutural em fotomicroscópio [10]. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo operador.

5.1.2.4 Classificação dos folículos ovarianos pré-antrais

Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais, uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso circundando o oócito; primários, uma única camada de células da granulosa de formato cúbico envolvendo o oócito; ou secundários, oócitos envolvidos por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico [11]. A morfologia folicular foi avaliada de acordo com a integridade da membrana basal, a densidade celular, a presença ou ausência de corpos picnóticos no núcleo do oócito e a integridade do oócito [12]. Com base nestes parâmetros, foram considerados apenas folículos morfologicamente normais.

As secções foram examinadas em um microscópio de luz (L2000, Bioval, Bioquímica, São Paulo, Brasil). Com o auxílio de uma ocular micrométrica, o diâmetro médio do oócito e do núcleo do oócito foi determinado utilizando-se dois folículos de cada classe folicular (primordial, primário e secundário) por secção avaliada [10].

Foram examinadas 1337 lâminas, contados 227.839 folículos, resultando na estimativa de total de 6.704.947 folículos pré-antrais.

5.1.2.5 Quantificação folicular

O número de folículos pré-antrais foi estimado, pela contagem dos folículos em cada secção, usando o núcleo do oócito como referência e o fator de correção, usando a fórmula $Nt = (No \times St \times ts) / (So \times do)$, sendo: Nt = Número total calculado de um tipo de folículo; No = Número de folículos observados no ovário; St = Número total de cortes feitos no ovário; ts = Espessura do corte; So = Número total de cortes observados; do = Diâmetro médio do núcleo do oócito de cada tipo de folículo [13].

5.1.2.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como mediana \pm erro padrão (EP). Os dados foram analisados utilizando o programa Bioestat 5.0 [14]. Como não houve distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos. Para todas as avaliações $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5.1.3 Resultados

O número médio de folículos pré-antrais está representado na Tabela 1.

Não houve diferença entre o número de folículos pré-antrais de fêmeas pré-púberes de pequeno e médio porte ($p=0,0659$) e entre adultas de pequeno e médio porte ($p=0,4171$). Fêmeas pré-púberes de médio porte

apresentaram maior quantidade de folículos pré-antrais ($p < 0,05$) comparado às fêmeas adultas.

Na Tabela 2, está representada a quantidade de folículos pré-antrais por ovário (direito e esquerdo) entre cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte. Houve variação no número de folículos pré-antrais entre ovários da mesma fêmea. Esta variação foi observada em 80% das cadelas pré-púberes de pequeno porte, em 20% das cadelas pré-púberes de médio porte; e em 40% das adultas de pequeno porte e 70% das adultas de médio porte. Dentre as fêmeas que apresentaram maior variação, a quantidade de folículos pré-antrais esteve entre 1.461 folículos (ovário direito) e 57.707 folículos (ovário esquerdo) nas pré-púberes de pequeno porte, 358.482 folículos (ovário direito) e 231.279 folículos (ovário esquerdo) nas pré-púberes de médio porte, 76.586 folículos (ovário direito) e 212.520 folículos (ovário esquerdo) nas adultas de pequeno porte e 52.423 folículos (ovário direito) e 107.267 folículos (ovário esquerdo) nas adultas de médio porte (Figuras 4 e 5).

Avaliando-se somente o ovário direito, houve diferença entre o número de folículos pré-antrais entre fêmeas pré-púberes de médio porte e adultas de médio porte ($p \leq 0,05$). Entretanto, não houve diferença entre a população de folículos pré-antrais dos grupos avaliados, considerando somente o ovário esquerdo.

Figura 1 – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário evidenciando folículos primordiais em um aumento de 400x. Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina.

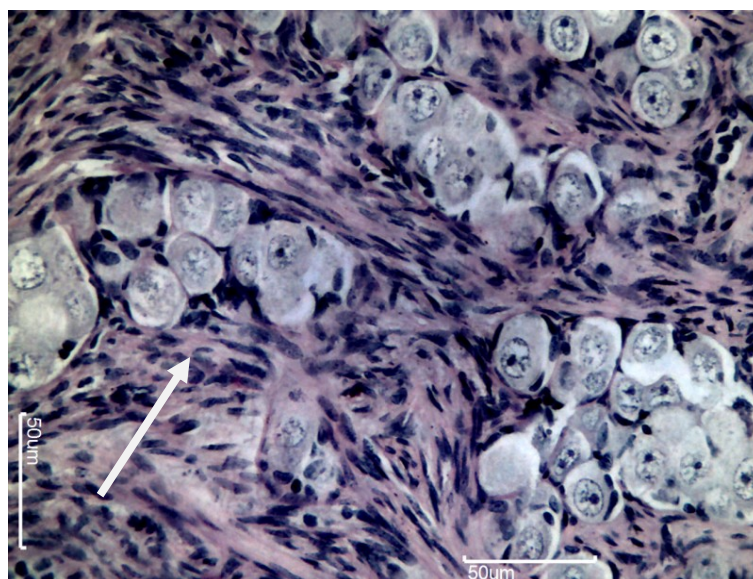


Figura 2 – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário de cadela evidenciando folículos primários, em um aumento de 400x. Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina.

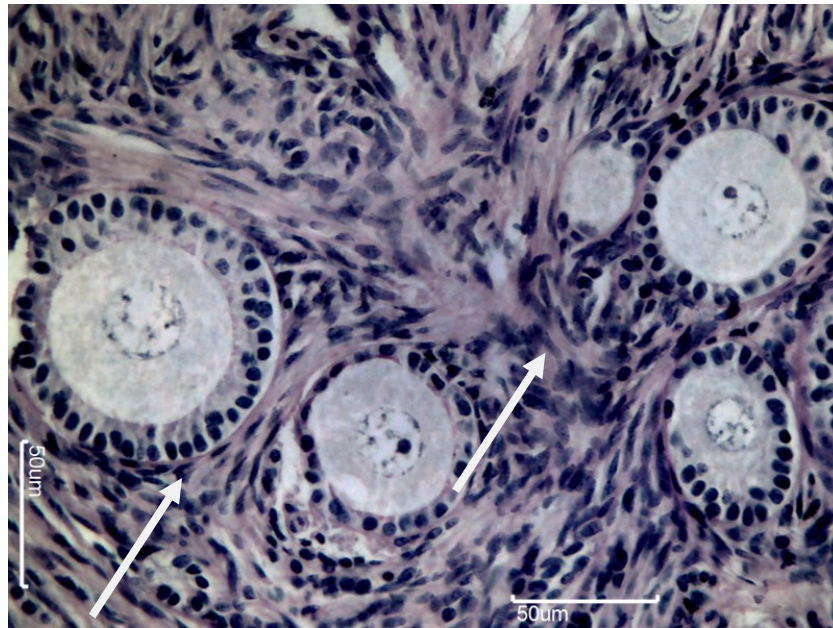


Figura 3 – Imagem fotográfica de secção histológica do ovário de cadela evidenciando folículo secundário, em um aumento de 400x. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina.

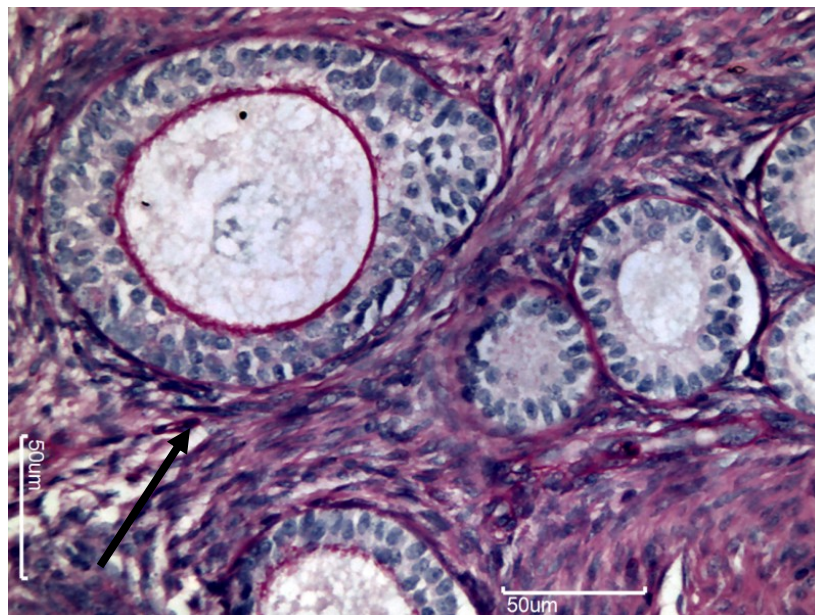


Tabela 1 – Mediana \pm EP de folículos pré-antrais nos ovários de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.

Grupos	Número de Folículos Pré-antrais por Fêmea			
	Primordial	Primário	Secundário	Total
Pré-púberes pequeno porte (\pm 5,51kg, n=20)	46.954 \pm 17.634 ^{ab}	1.819 \pm 2.112 ^a	627 \pm 365 ^b	51.611 \pm 18.577 ^{ab}
Pré-púberes médio porte (\pm 12,65kg, n=20)	131.125 \pm 20.210 ^a	4.245 \pm 1.704 ^a	1.609 \pm 584 ^a	143.562 \pm 21.718 ^a
Adultas pequeno porte (\pm 6,52kg, n=20)	47.150 \pm 10.532 ^b	2.345 \pm 459 ^a	1.297 \pm 284 ^a	49.546 \pm 10.951 ^b
Adultas médio porte (\pm 13,23kg, n=20)	24.345 \pm 14409 ^b	2.032 \pm 1.173 ^a	1.553 \pm 393 ^a	28.090 \pm 15.705 ^b

Medianas seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Mediana \pm EP do número de folículos pré-antrais dos ovários (direito e esquerdo) de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte

Grupos	Número de Folículos Pré-antrais por Ovário	
	Direito	Esquerdo
Pré-púberes pequeno porte (\pm 5,51kg, n=20)	53.723 \pm 28.045 ^{ab}	51.612 \pm 25.867
Pré-púberes médio porte (\pm 12,65kg, n=20)	156.446 \pm 35.010 ^a	130.210 \pm 27.258
Adultas pequeno porte (\pm 6,52kg, n=20)	58.793 \pm 10.801 ^{ab}	47.706 \pm 19.506
Adultas médio porte (\pm 13,23kg, n=20)	42.373 \pm 14.174 ^b	23.382 \pm 28.624

Medianas seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Figura 4 – Gráficos demonstrando a variação no número de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas pré-púberes de pequeno porte (A), pré-púberes de médio porte (B)

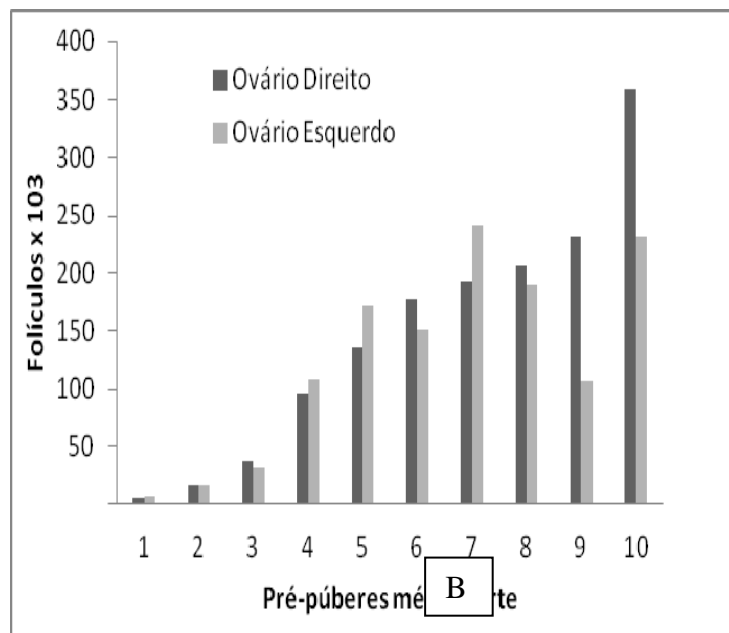
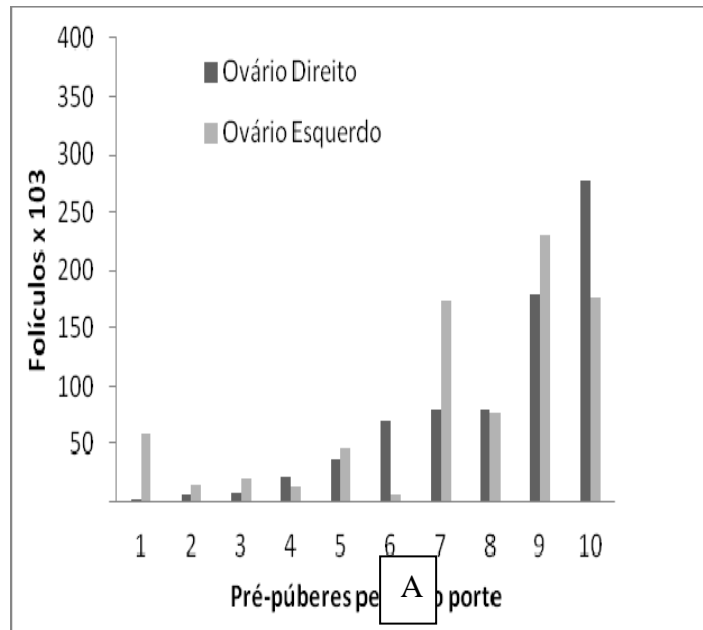
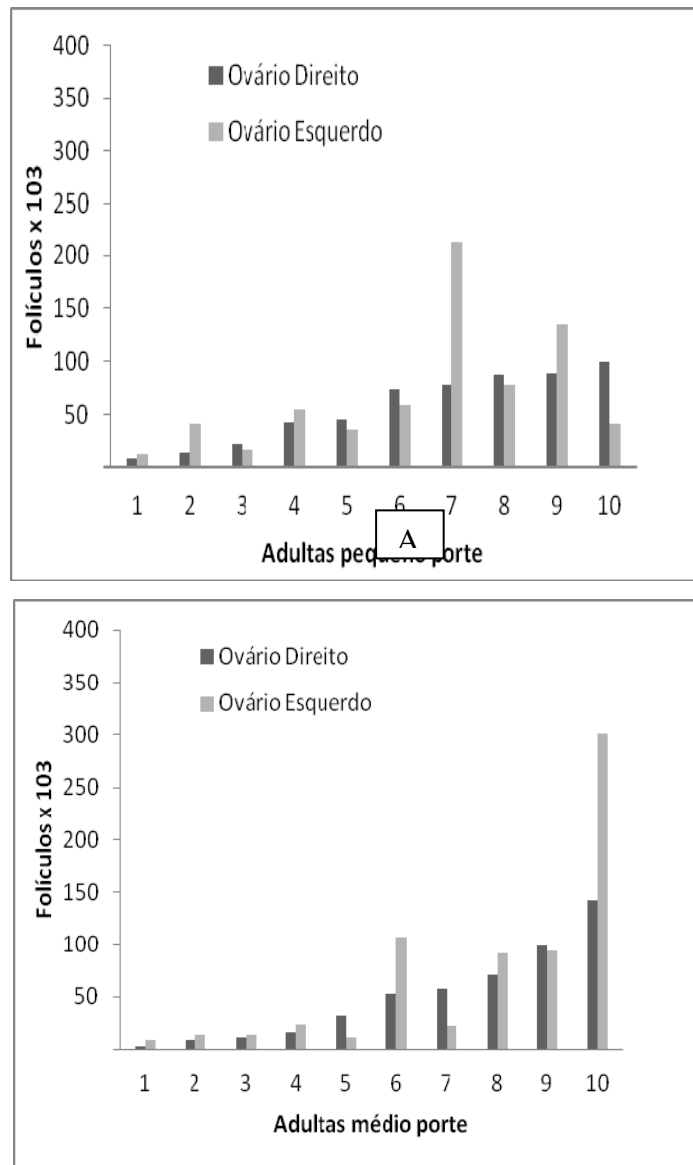


Figura 5 – Gráficos demonstrando a variação no número de folículos pré-antrais nos ovários de fêmeas adultas de pequeno porte (A), adultas de médio porte (B)



5.1.4 Discussão

Pela primeira vez foi realizado um estudo comparativo da população de folículos pré-antrais entre cadelas pré-púberes e adultas, contribuindo para elucidar o número de folículos pré-antrais nesta espécie; embora alguns estudos sobre a estimativa populacional de folículos pré-antrais, sejam encontrados na literatura [15;16], estes não consideraram as diferenças de idade, porte dos animais e ovários "direito-esquerdo".

Neste estudo o número médio de folículos pré-antrais encontrados em cadelas pré-púberes (n=40) foi de 107.152 e em cadelas adultas (n=40) foi de 60.461. Observou-se uma média (n=80) de 83.812 folículos pré-antrais, sendo que a média encontrada por Dolezel et al. (2004) foi de 474 e por Rolo (2012) foi de 47.900 folículos pré-antrais. No entanto, Dolezel et al. (2004) utilizaram imunohistoquímica, considerando que somente 20 campos (50 mm² do ovário) foram observados. Já Rolo (2012) detectou 47.900 folículos pré-antrais em um dos ovários, por processo histológico com fixador Carnoy, enquanto nosso trabalho avaliou ambos os ovários.

A análise de um só ovário teria subestimado ou superestimado os resultados obtidos, comparado com a avaliação do par de ovários devido a grande variação individual. Entretanto, caso tivesse sido utilizado somente o ovário esquerdo, os resultados seriam diferentes dos encontrados quando utilizado a somatória dos dois ovários, pois não seria observada nenhuma diferença entre os grupos. Da mesma forma analisando somente o ovário direito, obtivemos uma diferença somente entre fêmeas pré-púberes de médio porte e adultas de médio porte (p<0,05), diferente do resultado quando utilizado o par de ovários. A análise de somente um dos ovários não constataria a grande variação individual entre os ovários, que compreende extremos de 1.461 a 358.482, que ocorreram nos grupos e entre cadelas do mesmo grupo. Esta consideração é importante, já que muitos trabalhos utilizam somente um dos ovários ou os utiliza aleatoriamente, sendo que o maior número de oócitos recuperados otimizaria os experimentos em biotecnologia.

Fêmeas pré-púberes e adultas com no máximo cinco anos foram usadas visando obter informações a respeito da população folicular antes do primeiro estro e antes do possível declínio das funções ovarianas. Os grupos foram subdivididos, pois as fêmeas de menor porte possuem um intervalo entre estro menor que as fêmeas de maior porte [17], assim, optou-se por investigar se estas fêmeas possuíam maior número de folículos em seus ovários, visto que há em média dois estros por ano, enquanto fêmeas de médio e grande porte entram em estro em média uma vez ao ano [18]. Rolo (2012), utilizou 10 cadelas de raças distintas com idade entre 6 meses a 8 anos não considerou a diferença de *status* reprodutivo e porte. Dolezel et al. (2004) descreveram que as fêmeas mais jovens (\leq 6 anos) apresentaram uma quantidade maior de folículos do que as fêmeas mais velhas (7 a 11 anos), sem considerar porte e *status* reprodutivo. Desta forma, temos a segurança de nossos dados serem representativos, devido à quantidade de

ovários obtidos e pela separação dos grupos em diferentes portes e *status* reprodutivo.

Optou-se também na utilização de fêmeas de menor porte, pois são de fácil manipulação e custo da cirurgia ser menor, além de contribuir para a diminuição do risco de doenças e tumores de mamas nas fêmeas pré-púberes, já que foram cadelas sem raça definida e oriundas de programa de posse responsável. A possibilidade de obtenção de oócitos ser maior nas fêmeas de pequeno porte facilitará e direcionará o uso dessas cadelas em programas de biotecnologia.

Neste trabalho, a realização de cortes seriados de 5 μm a cada 70 secções possibilitou a visualização da maioria dos folículos. Rolo (2012) realizou cortes seriados de 5 μm a cada 120 secções, no entanto utilizando cortes maiores ou secções maiores, a possibilidade de perder folículos aumenta, assim como cortes muito próximos, como realizados por Diagone et al. (2008) aumenta a chance de contar o mesmo folículo, visto que um folículo primordial tem um tamanho médio de 25 μm .

Os folículos primordiais foram as estruturas predominantes (92,2%), seguidos pelos folículos primários e secundários, corroborando com os resultados descritos por outros autores e também em outras espécies [10, 16]. Este achado demonstra que a população de folículos primordiais está em maior quantidade no ovário e por esta razão a utilização destes folículos em biotecnologia da reprodução assistida, poderia explicar a dificuldade encontrada na maturação oocitária *in vitro*, visto que os oócitos primordiais necessitam de mais tempo e provavelmente possuem maiores exigências para a maturação efetiva.

A comparação numérica e não apenas a significância estatística no caso da população folicular em cadelas é interessante, pois a variação entre indivíduos é extremamente grande dificultando a aplicação de qualquer modelo estatístico, principalmente por serem fêmeas castradas em um programa de controle de natalidade, onde na maioria das vezes não possuem informações a respeito do histórico familiar e reprodutivo, além de não apresentar padrão racial.

Em função dos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que houve grande variação entre os grupos (pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte) e entre indivíduos do mesmo grupo. A utilização de oócitos de cadelas pré-púberes em programas de biotecnologias da reprodução seria mais interessante devido à maior quantidade de folículos pré-antrais ovarianos. Por fim, recomenda-se

considerar a grande variabilidade entre os ovários direito e esquerdo, pois a utilização de apenas um deles pode subestimar ou superestimar a população folicular ovariana.

5.1.5 Referências

- [1] Apparicio-Ferreira, M.; Alves, AE.; Pires-Butler, EA.; Ribeiro, APC.; Covizzi, GJ; Vicente, WRR. Effects of Hormonal Supplementation on Nuclear Maturation and Cortical Granules Distribution of Canine Oocytes During Various Reproductive Stages. *Reproduction in Domestic Animals*; v. 46, n. 5, p. 896-903, OCT 2011.
- [2] Telfer EE. In vitro development of pig preantral follicles. *Reproduction Suppl* v. 58, p. 81–90, 2001
- [3] Figueiredo JR, Amorim CA, Lucci CM, Gonçalves PBD. Isolation and in vitro culture of ruminant preantral follicles. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 27, p. 11-31, 1999.
- [4] Ribeiro APC, Pires EA, Apparício M, Alves E, Carareto R, Vicente WRR. Maturação in vitro de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.50-57,2010.
- [5] Nickson, DA; Boyd, JS; Eckershall, PD; Ferguson, JM; Harvey, MJA; Renton, JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.47, p. 231-240, 1993.
- [6] Durrant, BS; Pratt, NC; Russ, KD; Bolamba, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v. 49, n.5, p. 917-932, 1998.
- [7] Fossum, TW. *Cirurgia de pequenos animais*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1314p.2008.
- [8] Crookham, J.; Dapson, R. *Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory*, 2nd ED, Anatech. 1991
- [9] Diagone, K.V.; Vicente, W.R.R.; Pacheco, M.R.; Mateus, O. Oocyte Morphometry in Female Dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). *Anatomy Histology Embryology*. 37, p. 81–85. 2008.
- [10] Silva-Santos, K.C.; Santos, G.M.G.; Siloto, L.S.; Hertel, M.F.; Andrade, E.R.; Rubin, M.I.B. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v.6, p. 1051-1057, 2011.
- [11] Hulshof, S.C.J.; Figueiredo, J.R.; Beckers, J.F.; Bevers, M.M.; Van Den Hurk, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, v.16, n.2, p.78-80, 1994.

- [12] Carámbula, S.F.; Gonaves, P.B.D.; Costa, L.F.S.; Figueiredo, J. R.; Wheeler, M.B.; Neves, J.P.; Mondadori, R.G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology*, v.52, p.563-571. 1999.
- [13] Gougeon, A.; Chainy, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, p.433-442, 1987.
- [14] Ayres, M.; Ayres Jr.; M., Ayres, D.L., SANTOS, A.S. *BioEstat 5.0. Statistical applications in biological and medical sciences*. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 70 pp. 2007.
- [15] Dolezel, R.; Kylianikova, R.; Kummer, V.; Maskova, J.; Stara, P.; Vitasek, R. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. *Acta Veterinaria*, v.73, p. 37. 2004.
- [16] Rolo, J.L.J.P. Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2012.
- [17] Davidson, A. Current concepts on infertility in the bitch. *International Veterinary Information Service*, v.16, n. 2, 2006.
- [18] Gerosa, R.M. *Geriatrics Canina*. Buenos Aires. Inter-médica, 2007.

5.2 ARTIGO 2

INCIDÊNCIA DE FOLÍCULOS MULTIOÓCITOS EM OVÁRIOS DE CADELAS PRÉ-PÚBERES E ADULTAS DE PEQUENO E MÉDIO PORTE^a

N.T. Lunardon; K.C. Silva-Santos; M.A.O. Muçouçah; G.T. Dessunti; R.C. Justino;
M.M.Seneda; M.I.M. Martins^b

Este artigo científico esta de acordo com as normas para a publicação na **Reproduction in Domestic Animals**, conforme o site:

<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291439531/homepage/ForAuthors.html>

Resumo: Os folículos de mamíferos, na maioria dos casos, contem somente um oócito por folículo, mas podem existir folículos com mais de um oócito, que são chamados de folículo multioócito ou poliovular. O objetivo deste trabalho foi estimar a incidência de folículos multioócitos em ovários de fêmeas caninas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte. Oitenta ovários provenientes de quarenta fêmeas caninas (pré-púberes, n=20; adultas, n=20), de pequeno e médio porte, foram obtidos por ovariohisterectomia eletiva. Imediatamente após a obtenção, os ovários foram imersos em fixador Bouin para processamento histológico. Posteriormente os ovários foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e cortados seriadamente a intervalos de 5 µm. Cada 70° secção histológica, montado uma lâmina com o tecido e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. Foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos, considerando significativo $p \leq 0,05$. Entre as fêmeas avaliadas 55% apresentaram folículos multioócitos e a maioria continha duas a três células germinativas, mas ocasionalmente, folículos com até 12 oócitos foram observados. Os resultados (mediana \pm erro padrão) demonstraram que as fêmeas pré-púberes de médio porte apresentaram uma quantidade maior de folículos multioócitos (91 ± 21) comparado com as adultas de médio porte (11 ± 28) e não houve diferença entre as fêmeas pré-púberes de pequeno porte (46 ± 31) e adultas de pequeno porte (102 ± 43). Concluindo, as fêmeas pré-púberes independente do porte, apresentaram maior frequência de MOFs (14/20) do que as fêmeas adultas (8/20).

Palavras-chave: Ovário. Multioócitos. Cadelas

^a Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Reprodução Animal DCV-CCA, Londrina, Paraná, Brasil.

^b Corresponding author: imartins@uel.br – M.I.M. Martins

5.2.1 Introdução

Em folículos de mamíferos, na maioria dos casos, contêm somente um oócito. Entretanto, podem existir folículos com mais de um oócito no seu interior, que são chamados de folículos multioócitos (MOF) ou poliovular (Payan-Carreira e Pires, 2008, Silva-Santos et al., 2011). Na literatura, os MOFs foram descritos desde 1926, por Hartman, mas trabalhos subsequentes contribuíram para verificar que os multioócitos estão presentes em uma gama de espécies, entre elas cadelas, coelhas, gatas e jacarés (Telfers e Gosden, 1987).

A frequência de MOFs é espécie e indivíduo dependente (Silva-Santos et al., 2011). Alguns autores relatam que no início da vida reprodutiva, as cadelas apresentam maior número de MOFs do que animais idosos, embora outros não relatem diferença no número de MOFs entre fêmeas jovens e adultas (Payan-Carreira e Pires, 2008; Stoker et al., 2008). Em mulheres e camundongas os MOFs são raros (< 3%), entretanto em cadelas representam cerca de 14% da população folicular. O número de oócitos no interior do MOF varia entre as espécies, conforme revisão realizada por Silva-Santos em 2011: de 2 a 24 oócitos em coelhas, 2 a 9 em cabras, 2 a 17 em cadelas e de 2 a 9 em vacas.

Três suposições poderiam explicar a existência de MOFs: a divisão de um oócito, a fusão de vários folículos diferentes ou a não separação de vários conjuntos de oogônias nos cordões sexuais. Esta última hipótese é a considerada mais provável, pois não se trata de um fenômeno patológico, mas de um “polimorfismo” devido ao desequilíbrio entre o número de células somáticas e germinativas (Reynaud, 2010).

O objetivo deste estudo foi comparar a população de folículos multioócitos de cadelas pré-púberes e adultas, de pequeno e médio porte.

5.2.2 Material e Métodos

5.2.2.1 Princípios éticos

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais e sob a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais

(CEUA) da Universidade Estadual de Londrina – PR, registrado sob processo nº CEUA 24531.2011, aprovado em reunião realizada em 2012.

5.2.2.2 Animais e obtenção dos ovários

Foram utilizados 80 ovários provenientes de 40 cadelas, colhidos de dois grupos, fêmeas pré-púberes e adultas, após a ovariectomia eletiva [7]. Os grupos foram separados em dois subgrupos de acordo com o peso, porte pequeno ($5,7 \pm 0,4$) e médio ($12,3 \pm 0,6$).

Dados em (mediana \pm erro padrão), as cadelas pré-púberes de pequeno porte apresentaram ($8 \pm 0,4$) meses de idade, e ($5,5 \pm 0,6$) kg de peso, já as pré-púberes de médio porte estavam com ($8 \pm 0,6$) meses de idade e ($11,4 \pm 0,9$) kg. As cadelas adultas de pequeno porte possuíam ($2 \pm 0,4$) anos de idade e ($6,4 \pm 0,4$) kg, enquanto as adultas de médio porte estavam com ($2 \pm 0,3$) anos de idade e ($12,7 \pm 0,7$) kg.

As cadelas ovariectomizadas foram oriundas de um programa de controle de natalidade, e não apresentavam patologia uterina e ovariana detectável macroscopicamente.

5.2.2.3 Processamento histológico

Imediatamente após a obtenção dos ovários, estes foram lavados em solução salina 0,9%, imersos em fixador Bouin, preparado com 0,9% ácido pícrico, 9% formaldeído e 5% ácido acético (Crookham e Dapson, 1991), por 24 horas a 4°C e posteriormente transferidos para o álcool 70% até o processamento histológico.

Os ovários foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. Posteriormente, infiltrados e embebidos em parafina. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes seriados de 5 μ m de espessura (Diagone et al., 2008) em micrótomo rotativo (RM2255, Leica®, Leica Biosystems Melbourne Pty LTD, Wetzlar, Alemanha). A cada 70° secção histológica, o tecido foi colocado em lâmina de vidro e corado com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina para análise estrutural em fotomicroscópio (Silva-Santos et al., 2011). Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo operador.

5.2.2.4 Classificação dos folículos multioócitos pré-antrais

Os MOFs pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais, uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso circundando o oócito; primários, uma única camada de células da granulosa de formato cúbico envolvendo o oócito; ou secundários, oócitos envolvidos por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico (Hulshof et al.,1994).

As secções foram examinadas em um microscópio de luz (L2000, Bioval, Bioquímica, São Paulo, Brasil).

5.2.2.5 Quantificação folicular

O número de MOFs pré-antrais foi estimado pela contagem dos folículos em cada secção, usando o núcleo do oócito como referência.

5.2.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007). Como não houve distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos. Para todas as avaliações $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5.2.3 Resultados E Discussão

Entre as fêmeas avaliadas 55% apresentaram folículos multioócitos. Os MOFs foram observados em todos os grupos, pré-púberes de pequeno porte (7/10), pré-púberes de médio porte (7/10), adultas de pequeno porte (5/10) e adultas de médio porte (3/10). As fêmeas pré-púberes independente do porte, apresentaram maior incidência de MOF's (14/20) do que as fêmeas adultas (8/20). A quantidade de folículos multioócitos diferiu entre fêmeas pré-púberes de médio porte e adultas de médio porte ($p < 0,05$), como representado na Tabela 1. A maioria dos MOFs continha duas a três células germinativas, mas ocasionalmente, folículos com até 12 oócitos foram observados.

Cadelas pré-púberes apresentaram maior frequência de MOFs primordiais (48,8% em pré-púberes de pequeno porte e 45,6% em pré-púberes de médio porte). Já nas cadelas adultas, foram observados em maior frequência MOFs secundários (47,0% em cadelas adultas de pequeno porte e 59,4% em cadelas adultas de médio porte).

Tabela 1 – Mediana \pm EP do número de folículos multioócitos pré-antrais de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.

Grupos	Número de MOF's por Fêmea			
	Primordial	Primário	Secundário	Total
Pré-púberes pequeno porte (n=7)	29 \pm 15 ^{ab}	15 \pm 12	11 \pm 4	46 \pm 31 ^{ab}
Pré-púberes médio porte (n=7)	36 \pm 13 ^a	22 \pm 5	31 \pm 6	91 \pm 21 ^a
Adultas pequeno porte (n=5)	16 \pm 13 ^{ab}	14 \pm 12	23 \pm 21	102 \pm 43 ^{ab}
Adultas médio porte (n=3)	8 \pm 3 ^b	1 \pm 7	2 \pm 19	11 \pm 28 ^b

Medianas seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Neste trabalho foram observados MOFs em 70% dos ovários de cadelas pré-púberes e somente 40% dos ovários de cadelas adultas, semelhante ao relatado anteriormente (Telfers e Gosden, 1987; Payan-Carreira e Pires, 2008). Telfer e Gosden (1987) relataram uma frequência MOFs 14% em cadelas de 1 a 2 anos de idade, e apenas 5% em animais com mais de 7 anos. Já Payan-Carreira e Pires (2008) para os mesmos grupos etários, a prevalência MOFs foi de 50% e 24,4%.

Os efeitos da idade aparentemente não influenciam entre espécies, porém na cadela, as informações são controversas, a maior parte dos trabalhos conclui que a quantidade de multioócitos diminui conforme aumenta a idade (Telfers e Gosden, 1987; Payan-Carreira e Pires, 2008).

O fato das fêmeas pré-púberes apresentar maior quantidade de MOFs e maior incidência comparando com as adultas, pode ser explicado pela

presença dos MOFs depender do equilíbrio de esteróides sexuais e gonadotrofinas hipofisárias que podem estar afetado em fêmeas mais velhas (Kent, 1959; Graham & Bradley, 1971). Assim como também há de se considerar que o ambiente ovariano proporcionado por fêmeas mais velhas não seria suficiente para o crescimento dos MOFs (Telfer e Gosden, 1987). Porém, considerando a hipótese de que a população de folículos é pré-determinada e que os MOFs seriam resultados de polimorfismo durante a foliculogênese, sendo este evento dependente ou não de esteróides e gonadotrofinas, a redução dos MOFs nas cadelas mais velhas seria pela redução do *pool* de reserva desses folículos (Telfer e Gosden, 1987).

Nos trabalhos disponíveis, os autores não compararam animais de portes diferentes (Telfer e Gosden, 1987; Payan-Carreira e Pires, 2008), em nosso estudo foi comparado fêmeas de pequeno e médio porte, porém não houve diferença entre os portes na incidência e quantidade de MOFs, ou seja, o porte neste caso não interferiu na produção de MOFs.

Os estudos dos MOFs em cadelas atrai interesse também pela possível contribuição desses folículos no tamanho da ninhada. Em um estudo utilizando avaliação morfológica do ovário de cadelas gestantes o número de corpos lúteos nos ovários foi menor do que o número de fetos, sugerindo a ovulação de MOFs, no entanto ainda são necessários estudos para verificar a relação entre a fertilidade da cadela e a presença de MOFs (Payan-Carreira e Pires, 2008).

Embora as estruturas sejam tipicamente descritas no início da foliculogênese, há uma escassez de informações sobre MOFs. A utilização dos MOFs obtidos de ovários de ratas, na fecundação *in vitro*, já foi realizada por Iguchi et al (1991) e conseguiram fazer com que oócitos de MOFs chegassem até o estágio de blastocisto, porém *in vivo* ainda fica a dúvida se poderiam ovular.

Concluimos que houve maior quantidade de MOFs em cadelas pré-púberes de médio porte comparado a cadelas adultas de médio porte. A maioria dos MOFs possuíam 2 oócitos por folículo e estavam em maior quantidade nos folículos primordiais. Para esclarecimentos sobre a fisiologia dos MOFs e também a futura utilização deles em biotecnologias da reprodução, seria interessante a utilização de fêmeas pré-púberes, visto que estas apresentaram uma quantidade maior de MOFs em seus ovários, embora o fator limitante seria o número maior em primordiais o que poderia dificultar o cultivo.

5.2.4 Referências

- Ayres, M.; Ayres Jr. M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. BioEstat 5.0. Statistical applications in biological and medical sciences. Sociedade Civil Mimirauá, Brasília, CNPq, 70 pp. 2007
- Crookham, J.; Dapson, R. Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory, 2nd ED, Anatech. 1991.
- Diogone, K.V.; Vicente, W.R.R.; Pacheco, M.R.; Mateus, O. Oocyte Morphometry in Female Dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). *Anat. Histol. Embryol.* 37: 81–5, 2008.
- Graham, CE. & Bradley, CF. Polyovular follicles in squirrel monkeys after prolonged diethylstilboestrol treatment. *J. Reprod. Fert.* 11:181-5, 1971.
- Hartman, C.G. Polynuclear ova and polyovular follicles in the opossum and other mammals with special reference to the problem of fecundity. *Am J Anat*, 37:1–52, 1926.
- Hulshof, S.C.J.; Figueiredo, J.R.; Beckers, J.F.; Bevers, M.M.; Van Den Hurk, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, 16: 78-80, n.2, 1994.
- Iguchi, T.; Kamiya, K.; Uesugi, Y.; Sayama, K.; Takasugi, N. In vitro fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In vivo*, 5:359-63, 1991.
- Kent, H.A., Jr. Reduction of polyovular follicles and polynuclear ova by oestradiol monobenzoate. *Anat. Rec.* 134:162-455, 1959.
- Payan- Carreira, R.; Pires, M.A.. Multioocyte follicles in domestic dogs: a survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*; 69:977-82, 2008.
- Reynaud, K.; Halter, S; Tahir, Z.; Thoumire, S.; Chebrou, M.; Chastant-Maillard, S. Les follicules polyovocytaires. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 38: 395- 7, 2010.
- Silva-Santos, K.C.; Santos, G.M.G.; Siloto, L.S.; Hertel, M.F.; Andrade, E.R.; Rubin, M.I.B.; et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 6: 1051- 7, 2011.
- Stoker, C.; Beldoménico, P.M.; Bosquiazzo, V.L.; Zayas, M.A.; Rey, F.; Rodríguez, H.; Muñoz-De-Toro, M.; Luque, E.H.. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology*; 156:603-12, 2008.
- Telfer, E.; Gosden, R.G. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal Zoo*, 211: 169- 75, 1987.

6 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo da população de folículos pré-antrais entre cadelas pré-púberes e adultas é o primeiro que considera o *status* reprodutivo e o tipo corpóreo das fêmeas, embora alguns estudos sobre a estimativa populacional de folículos pré-antrais, sejam encontrados na literatura, estes não consideraram as diferenças de idade e porte dos animais (Dolezel et al, 2004; Rolo, 2012).

Neste estudo o número médio de folículos pré-antrais encontrados em cadelas pré-púberes (n=40) foi de 107.152 e em cadelas adultas (n=40) foi de 60.461, enquanto a média (n=80) foi de 83.812 folículos pré-antrais, distinguindo de outros estudos, ou seja, obtendo uma quantidade superior de folículos pré-antrais. Isto é devido a quantificação ter sido realizada no par de ovários de cada cadela.

Devido a grande variação individual, a aplicação de qualquer modelo estatístico foi dificultada, embora não tenha sido observada diferença significativa entre a população de folículos pré-antrais do ovário direito e esquerdo, a análise de um só ovário teria alterado os resultados obtidos, comparado com a avaliação do par. Esta consideração é importante, já que muitos trabalhos utilizam somente um dos ovários ou os utiliza aleatoriamente, sendo que o maior número de oócitos recuperados é importante em experimentos em biotecnologia.

Os folículos primordiais foram as estruturas predominantes (92,2%), seguidos pelos folículos primários e secundários, o que demonstra que a população de folículos primordiais está em maior quantidade no ovário. Esse fato poderia explicar a dificuldade encontrada na maturação oocitária *in vitro*, visto que os oócitos primordiais necessitam de mais tempo e provavelmente possuem maiores exigências para a maturação efetiva.

A comparação numérica e não apenas a significância estatística no caso da população folicular em cadelas é interessante, pois a variação entre indivíduos é extremamente grande dificultando a aplicação de qualquer modelo estatístico, principalmente por serem fêmeas castradas em um programa de controle de natalidade, onde na maioria das vezes não possuem informações a respeito do histórico familiar e reprodutivo, além de não possuírem um padrão racial.

Neste trabalho foram observados MOFs em 70% dos ovários de cadelas pré-púberes e somente 40% dos ovários de cadelas adultas, semelhante ao relatado anteriormente (Telfers e Gosden, 1987; Payan-Carreira e Pires, 2008). Foi

comparado fêmeas de pequeno e médio porte, porém não houve diferença entre os portes na frequência e quantidade de MOFs, ou seja, o porte neste caso não interfere na produção de MOFs.

Houve uma maior frequência de MOFs contendo 2 oócitos por folículo, no entanto foi encontrado folículos com até 12 oócitos em seu interior, porém alguns deles estavam degenerados.

CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos conclui-se que:

- Houve grande variação no número de folículos pré-antrais entre os grupos (pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte) e entre indivíduos do mesmo grupo.
- Não se recomenda utilizar somente um dos ovários para estimar a população de folículos pré-antrais em cadelas, devido à grande variabilidade individual entre os ovários, o que pode subestimar ou superestimar os resultados.
- Houve maior quantidade de MOFs em cadelas pré-púberes de médio porte comparado a cadelas adultas de médio porte.