



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SUELLEN MIGUEZ GONZÁLEZ

**DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
EM OVÁRIOS EQUINOS**

Londrina
2016

SUELLEN MIGUEZ GONZÁLEZ

**DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
EM OVÁRIOS EQUINOS**

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 (Área de Concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G643d González, Suellen Miguez
Distribuição regional de folículos pré-antrais em ovários equinos / Suellen Miguez
González. – Londrina, 2016.
73 f. : il.

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

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos ovarianos – Teses. 3. Equino –
Teses. 6. Câncer – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual
de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082

SUELLEN MIGUEZ GONZÁLEZ

**DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM
OVÁRIOS EQUINOS**

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 (Área de Concentração: Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Londrina, 18 de fevereiro de 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.

Ao meu pai José Antônio (*in memoriam*)

A minha mãe Rosana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de efetuar uma pós-graduação na UEL e trabalhar com a equipe do REPROA.

Agradeço o apoio, dedicação e carinho do meu pai José Antônio (*in memoriam*) e minha mãe Rosana. Amo vocês!

Agradeço a minha irmã Suillan, meu sobrinho Heron e meu cunhado Mateus por toda ajuda e por não medirem esforços em me ajudar sempre que necessitei.

Agradeço ao meu orientador Professor Marcelo Seneda pela imensa confiança e consideração que teve por mim durante todo período do mestrado. Trabalhar com o senhor foi um enorme privilégio e não encontrarei palavras para descrever toda a minha gratidão, muito obrigada!

Agradeço a minha amiga e parceira de pesquisas Camila Bizarro por todos os momentos animados, felizes e de muita consideração e respeito profissional e pessoal em que vivemos.

Agradeço aos Professores Thales e Wanessa (UENP) pelo apoio durante a graduação e ingresso na pós-graduação. Agradeço a Deus por ter convivido com profissionais de tão alto gabarito e ética.

Agradeço a minha co-orientadora Katia por todo aprendizado científico e pessoal do ramo da pesquisa. E também pelo apoio, amizade e consideração em todos os momentos que precisei.

Agradeço a Professora Lívia por ter participado da minha banca de qualificação e também por permitir que sua ideia e pesquisa sobre localização de FOPA em equinos prosseguisse. Muito obrigada pela confiança!

Agradeço a Professora Roberta pelo incentivo no ingresso da pós-graduação e na equipe do REPROA. É uma honra tê-la na minha banca de defesa.

Agradeço imensamente a equipe do REPROA por todos os experimentos, congressos, simpósios e lanchinhos em que tive o prazer de compartilhar. Meu muito obrigada para: Camila Rosa, Ferzinha, Andressa, Isabela, Fabiana, Fábio, Larissa, Camila Costa, Marilu, Luciana, Anne, João Vitor, Gustavo, Eleni, Lhays, Emanuel, Alethéia, Polyana e Paulinha.

Agradeço ao grupo do Cultivo-REPROA pela dedicação e união na execução de todos os experimentos. Foi um privilégio fazer parte deste grupo e conviver com todos vocês!

Agradeço à Capes pela bolsa científica concedida durante a execução deste trabalho, bem como a coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Professora Ana Paula Bracarense. E à Helenice, secretária da pós-graduação. Obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

ALBERT EINSTEIN

RESUMO

GONZÁLEZ, Suellen Miguez. **Distribuição regional de folículos pré-antrais em ovários equinos**. 2016. 149f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

O objetivo desse estudo foi determinar a distribuição dos folículos pré-antrais equinos no tecido ovariano, avaliando as regiões interna, média e externa do ovário, bem como as regiões próximas e distantes da fossa ovulatória. Ovários (n=7) de éguas provenientes de abatedouro foram dissecados e seccionados no plano sagital (curvatura maior) resultando em dois hemiovários. Estes foram fragmentados e imersos no fixador *Carnoy* por 12 horas e mantidos em álcool 70 % até o processamento histológico. No experimento 1 (n=3), delimitou-se à distribuição folicular em regiões ovariana interna (C1), média (C2) e externa (C3). No experimento 2 (n=4) investigou-se a delimitação das regiões próximas (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória. A análise estatística para comparação dos dados foi realizada utilizando o teste Exato de Fisher, com nível de 5% de significância através do programa estatístico Minitab® 16.1.1. Encontramos, no primeiro experimento 1.130 folículos, destes 1.054 (93,3 %) eram folículos primordiais e 76 (4,7 %) em desenvolvimento. No experimento 2 foram encontrados 938 folículos, 894 (95,30%) folículos primordiais e 44 (4,7 %) em desenvolvimento. Houve diferença ($p < 0,05$) quanto a presença de folículos pré-antrais nas regiões interna (C1 41,6 %; 470/1130), média (C2 32,4 %; 366/1130) e externa (C3 26 %; 294/1130) do ovário equino. Estas três regiões diferiram quando comparadas entre si, porém a região C1 apresentou maior percentagem de folículos pré-antrais em relação às demais ($p < 0,05$). As regiões C2 e C3 apresentaram maior percentagem de folículos íntegros primordiais e em desenvolvimento que a região C1 ($p < 0,05$), desta forma a região interna obteve uma maior quantidade de folículos degenerados em relação às demais. As regiões próximas à fossa ovulatória (PFO1+PFO2 58,7 %; 551/938) apresentaram maior concentração folicular em relação à região distante da fossa ovulatória (DFO3+DFO4 41,3; 387/938; $p < 0,05$). A região DFO apresentou menor proporção de folículos degenerados primordiais e em desenvolvimento que a região PFO, demonstrando maior presença de folículos ovarianos íntegros ($p < 0,05$). Desta forma, a distribuição dos folículos pré-antrais no ovário equino ocorreu de forma heterogênea, apresentando maiores quantidades de folículos pré-antrais nas regiões interna e próxima da fossa ovulatória ($p < 0,05$). Este estudo sugere novos conceitos quanto a localização dos folículos ovarianos equinos, tais como pouca delimitação entre as camadas ovarianas e a presença de folículos na camada medular.

Palavras-chave: Folículos ovarianos, Fossa ovulatória, Localização folicular, Região ovariana, Égua.

ABSTRACT

GONZÁLEZ, Suellen Miguez. **Regional distribution of preantral follicles in equine ovaries.** 2016. 149f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - University State of Londrina. Londrina. 2016.

This study objective was to define the distribution of the equine preantral follicles in the ovarian tissue, evaluating the inner, middle and outer regions of the ovary, as well as the near and far regions from the ovulation fossa. Ovaries (n=7) of mares from slaughterhouse were dissected and sectioned in the saggital plane (greater curvature), resulting in two hemiovaries. These were fragmented and immersed in Carnoy fixative for histological processing. In the experiment 1 (n=3), the follicular distribution in inner (C1), middle (C2) and outer (C3) ovarian areas was delimited. In the experiment 2 (n=4), the delimitation of near (PFO) and far (DFO) regions from the ovulation fossa. Statistical analysis for comparison of data was performed using Fisher's exact test, with 5% level of significance using the statistical software Minitab 16.1.1. 1130 follicles were found in the first experiment, 1054 (93.3%) of these were primordial follicles and 76 (6.7%) were developing follicles. In the experiment 2, 938 follicles were found, 894 (95.30%) of these were primordial follicles and 44 (4.7%) were developing follicles. There were differences ($p < 0.05$) between the concentrations of pre-antral follicles in the inner (C1 41.6%, 470/1130), middle (C2 32.4%; 366/1130) and external (C3 26%; 294/1130) regions of the equine ovary. These three regions differed when compared to each other, although C1 region had the highest percentage of pre-antral follicles in relation to others ($p < 0.05$). The C2 and C3 regions showed a higher percentage of intact primordial follicles and developing ones than the C1 region ($p < 0.05$), this way, the inner region has obtained an increased amount of follicles degenerated in relation to the other. The regions close to ovulation fossa (PFO1+PFO2 58.7%; 551/938) had higher follicular concentration in relation to the distant region of ovulation fossa (DFO3 + DFO4 41.3; 387/938; $p < 0.05$). DFO region showed a lower proportion of degenerated primordial follicles and developing ones than the PFO region, demonstrating greater presence of intact ovarian follicles ($p < 0.05$). This way, the distribution of preantral follicles in the equine ovary occurred heterogeneously, with larger amounts of preantral follicles in the inner and near regions of ovulation fossa. This study suggests new concepts about the location of equine ovarian follicles, such as the small delimitation between ovarian layers and the follicles presence in the medulla layer.

Keywords: Ovarian follicles, Ovulation fossa, Follicular location, Ovarian region, Mare.

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1** Ilustração do ovário bovino e equino com as delimitações da região cortical e medular. Na espécie equina, os folículos pré-antrais localizam-se na região interna do ovário e, na espécie bovina, na região externa.....19
- Fig.2** Ilustrações referentes aos ligamentos e tecidos conectivos e dissecação do ovário equino (A e B). Ovários dissecados com folículos antrais visíveis (C e D).....20
- Fig.3** A porção interna do ovário refere-se à região clara da imagem, e a camada exterior compete à região de coloração castanha. **A:** As regiões com cores semelhantes delimitam as porções do ovário. **B:** A imagem foi dividida em três formas, na qual o córtex possui coloração branca e a medula está corada em cinza. **C:** As regiões correspondentes aos folículos apresentam-se em vermelho. **D:** Uma imagem composta de **B** e **C** e **D**.....22
- Fig.4** Alterações morfológicas do ovário equino ao longo dos primeiros 12 meses de vida. **A:** ovários de potras com 1 dia de idade, em que neste período, a maior parte do ovário é preenchido com a medula, e uma pequena parte refere-se à cortical. **B:** Ovários de potras com 110 dias de idade. As estruturas medulares apresentam-se mais evidentes na superfície do ovário, e ocorre a formação da fossa ovulação (ponta de seta), identificada pela primeira vez em potras de 3 meses de idade. **C:** Ovários de potras com 211 dias de idade. A visualização do formato característico da fossa de ovulação ocorre a partir dos 6 meses de idade. **D:** Ovários de potras com 351 dias de idade. Pode-se observar a presença de folículos com diversos diâmetros...23
- Fig.5** Proporção do volume do córtex, medula e ovários de potras com idade entre 0-12 meses.....24
- Fig.6** Folículos pré-antrais da espécie equina (B, D e F) e bovina (A, C e E). Folículos Primordiais A e B; Primários C e D; Secundários E e F. Aumento 40x.....35
- Fig.7** Ilustrações histológicas do tecido ovariano equino. (A) tecido ovariano interno com a presença de folículo primordial e (B) tecido ovariano externo com presença de vasos sanguíneos. Coloração PAS e Hematoxilina. Aumento de 20x.....39
- Fig.8** Ilustração demonstrativa das extensões ovarianas avaliadas referentes às regiões interna (C1), média (C2) e externa (C3) obtidas através de cortes verticais (1) e em seguida secções transversais para dividir cada as regiões em dois fragmentos (2).....55
- Fig.9** Ilustração demonstrativa dos fragmentos ovarianos avaliados referentes às regiões próximas (PFO1+PFO2) e distantes (DFO3+DFO4) da fossa ovulatória.....57

Fig.10 Agrupamento de folículos pré-antrais primordiais da espécie equina agrupados (A e B). Coloração de PAS e Hematoxilina. Aumento de 40x e 20x.....64

LISTA DE TABELAS

- Tab.1** Cronologia das etapas de diferenciação das gônadas em várias espécies de mamíferos (dias após a concepção).....26
- Tab.2** Número de folículos primordiais no ovário de mamíferos em diferentes idades (ou número de oócitos durante a gestação).....31
- Tab.3** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões interna (C1), média (C2) e externa (C3) e a proporção da integridade folicular; ($p < 0,05$).....60
- Tab.4** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões interna (C1), média (C2) e externa (C3) com a proporção de folículos normais (primordiais e em desenvolvimento) e degenerados (primordiais e em desenvolvimento; $p < 0,05$).....61
- Tab.5** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos em regiões próximas (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória e a proporção quanto à integridade folicular ($p < 0,05$).....63
- Tab.6** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões próximas (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória com a proporção de folículos normais (primordiais e em desenvolvimento) e degenerados (primordiais e em desenvolvimento; $p < 0,05$).....65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 PARTICULARIDADES DO OVÁRIO EQUINO	18
2.1.1 GÔNADAS FETAIS.....	21
2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NAS ESPÉCIES MAMÍFERAS	24
2.2.1 DIVISÃO MEIÓTICA	27
2.2.2 FORMAÇÃO DA RESERVA FOLICULAR OVARIANA.....	28
2.2.3 QUESTÕES SOBRE A RESERVA FOLICULAR OVARIANA	32
2.2.4 ATIVAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FOLÍCULOS OVARIANOS	33
2.2.5 ATRESIA FOLICULAR	35
2.3 HISTOLOGIA CLÁSSICA.....	37
REFERÊNCIAS.....	40
3. HIPÓTESE	47
4. OBJETIVOS	48
4.1 OBJETIVO GERAL.....	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	49
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Obtenção dos ovários	54
2.2 Processamento histológico	58
2.3 Classificação dos folículos	58
2.4 Análise estatística	59

3. RESULTADOS	59
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
6. CONCLUSÕES	71
7. APÊNDICES	72

1. INTRODUÇÃO

1
2
3 A reserva folicular ovariana é formada durante a vida fetal, ao qual permite
4 que os folículos pré-antrais estejam presentes no ovário ao nascimento (GOSDEN,
5 2004; ZUCKERMAN, 1951). Assim a quantidade de folículos primordiais (reserva
6 folicular ovariana) é um importante indicador da capacidade reprodutiva, podendo
7 influenciar no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, tais como: biópsia
8 ovariana, criopreservação do tecido ovariano, transplante e cultivo *in vitro* de
9 folículos. Tais estudos são propostos para conservar ou melhorar a fertilidade das
10 espécies mamíferas. Investigações recentes descritas na espécie equina relataram
11 melhorias nas taxas de maturação e fecundação referentes a oócitos aspirados *in*
12 *vitro* e *in vivo* (HINRICHS, 2010; SESSIONS-BRESNAHAN; GRAHAM;
13 CARNEVALE, 2014), porém, tais tecnologias reprodutivas têm sido desenvolvidas
14 de forma lenta (GALLI et al., 2007; GALLI et al., 2013).

15 O método *in vivo* de colheita de oócitos imaturos ainda não apresenta
16 resultados satisfatórios, sendo um dos fatores que retarda o avanço das
17 biotecnologias reprodutivas para esta espécie (TELFER; WATSON, 2000).
18 Recentemente, estudos demonstraram possibilidade de superar essa limitação
19 considerando-se a utilização dos folículos pré-antrais, já que estão presentes em
20 abundância no ovário. Estes estudos validaram o uso da ultrassonografia por via
21 transvaginal para realizar a biópsia do ovário e obter folículos pré-antrais em éguas
22 (HAAG et al., 2013a; HAAG et al., 2013b). Além disso, já foi proposto o cultivo *in*
23 *vitro* de pequenos fragmentos ovarianos para promover o desenvolvimento de
24 folículos pré-antrais equinos (GOMES et al., 2015). Tanto a biópsia ovariana quanto
25 a retirada de fragmentos ovarianos *in vitro* demonstraram dificuldade na obtenção de
26 folículos pré-antrais. É notório considerar que não é conhecida a distribuição

1 regional de folículos pré-antrais no ovário equino, apenas que a espécie equina
2 apresenta menor número de folículos pré-antrais no ovário comparando com outras
3 espécies (HAAG et al., 2013a; SZLACHTA; TISCHNER, 2002) e que estes
4 localizam-se na porção interna do ovário. Por isso, é notável investigar todas as
5 regiões do ovário equino para que seja possível determinar a distribuição dos
6 folículos ovarianos. Tais investigações poderão sugerir novos conceitos quanto a
7 localização dos folículos ovarianos, além de auxiliar no desenvolvimento das
8 biotécnicas reprodutivas utilizando oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais
9 equinos.

10 Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a distribuição
11 regional dos folículos pré-antrais equinos no tecido ovariano. Para tanto, delimitamos
12 os ovários nas regiões interna, média e externa, bem como as regiões próximas e
13 distantes da fossa ovulatória.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

2. REVISÃO DE LITERATURA

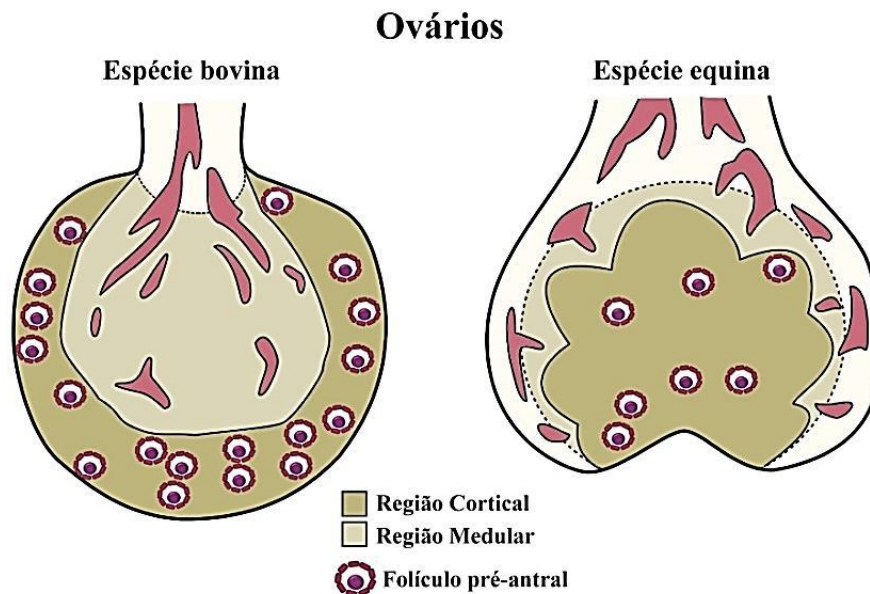
2.1 PARTICULARIDADES DO OVÁRIO EQUINO

Os ovários de éguas são estruturalmente únicos comparados com as demais espécies mamíferas. O formato dessa gônada assemelha-se com um feijão ou mesmo ao rim, diferindo da maioria dos mamíferos, nos quais possuem ovários com formato arredondado. A primeira característica notória é o tamanho. Os ovários da espécie equina são grandes comparados a espécie bovina, podendo medir entre 5 a 8 cm ao longo do seu eixo maior e 2 a 4 cm do eixo menor na estação anovulatória. Conforme a fase do ciclo estral, a forma do ovário altera-se, já que seus folículos antrais crescem até 4 a 5 cm de diâmetro, preenchendo a maior parte do parênquima deste órgão (BLANCHARD et al., 2003).

A segunda particularidade trata-se da localização dos folículos pré-antrais no ovário. A maioria dos autores nomeiam as camadas do ovário em cortical e medular. Essas camadas ovarianas são invertidas na espécie equina, sendo que a região cortical é interna e a medular externa (GINTHER, 1992; Figura 1). Apesar desta nomenclatura ser consagrada, optaremos por mencionar no restante do conteúdo a região cortical e medular como interna e externa.

Assim, a região mais interna, referente à borda mais ventral e côncava, inclui a fossa ovulatória, além dos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos. Na fossa ovulatória, identificada na curvatura menor do ovário, ocorre a ovulação na espécie equina (EVANS et al., 2007).

1 **Figura 1.** Ilustração do ovário bovino e equino com as delimitações da região
 2 cortical e medular. Na espécie equina, os folículos pré-antrais localizam-se na região
 3 interna do ovário e, na espécie bovina, na região externa.
 4



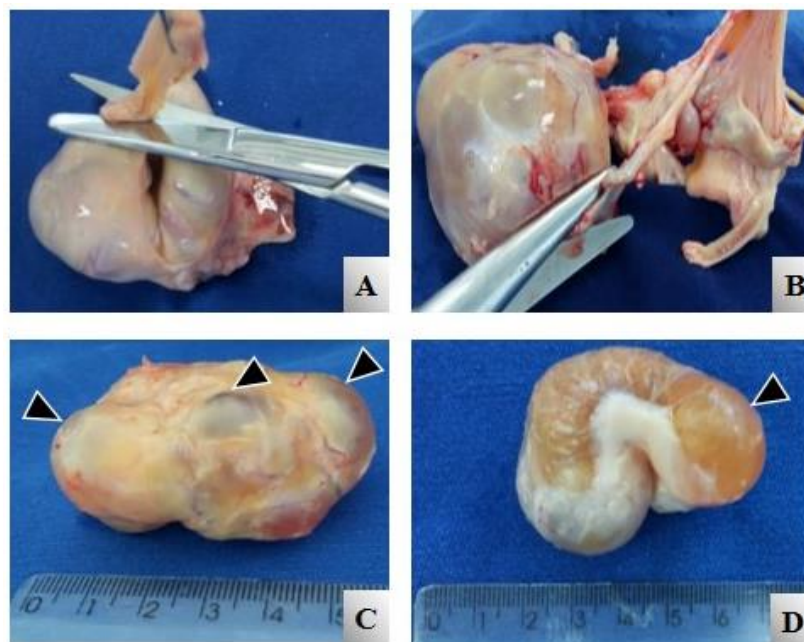
5
 6 **Fonte:** Adaptado Ginther (1992).

7
 8 A região vascular, referente à borda dorsal e convexa do ovário, abrange a
 9 porção mais externa e é constituída por tecido conjuntivo, algumas células
 10 musculares lisas, nervos, artérias e veias, responsáveis pela nutrição e sustentação
 11 do ovário, conhecida como hilo ovariano (HAFEZ, 1996; BLANCHARD et al., 2003;
 12 EVANS et al., 2007). A inversão das camadas interna e externa do ovário é apenas
 13 constatada em espécies de equídeos, além do tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*;
 14 ENDERS; BUCHANAN, 1957) e o roedor tuco-tuco (*Galea musteloides*; WEIR;
 15 ROWLANDS, 1974). Os ovários equídeos são revestidos por ligamentos e tecidos
 16 conectivos espessos que dificultam a visualização macroscópica dos folículos
 17 antrais. Por isso, para realizar procedimentos como aspiração *in vitro* desses

1 folículos é necessário a retirada de toda a túnica que envolve o ovário do equino.
2 Uma quantidade variável de tecido adiposo pode vir aderido aos tecidos conectivos.
3 Nota-se durante a dissecação dos ligamentos e tecidos conectivos do ovário equino
4 um maior sangramento, sugerindo que este é mais vascularizado em relação as
5 demais espécies (GONZÁLEZ et al., 2015; Figura 2; Apêndice 6).

6

7 **Figura 2.** Ilustrações referentes aos ligamentos e tecidos conectivos e dissecação
8 do ovário equino (A e B). Ovários dissecados com folículos antrais visíveis (C e D;
9 setas).



10

11

12 Quanto à localização dos ovários na cavidade abdominal, podem ser
13 encontrados entre a 3a. e 4a. vértebras lombares. Os ovários permanecem
14 suspensos na região sublombar pelo ligamento mesovárico, e este remete pouca
15 mobilidade na palpação transretal (BLANCHARD et al., 2003; EVANS et al., 2007).

16 Estima-se que a distância média do ovário até o orifício vulvar de éguas com
17 médio porte seja de 50-55 cm. Assim, o ovário direito recebe maior aporte

1 sanguíneo, enquanto o ovário esquerdo possui menor tamanho e localiza-se mais
2 próximo ao rim na cavidade abdominal (GETTY; SISSON; GROSSMAN, 1981).

3 O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou
4 gametogênica (produção e liberação de oócitos) e uma endócrina ou
5 esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteroides e de peptídeos).
6 Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para
7 o sucesso da reprodução (HAFEZ, 1996).

8

9 **2.1.1 GÔNADAS FETAIS**

10

11 A diferenciação das gônadas na espécie equina ocorre por volta de 39 a 45
12 dias de gestação. Estas se originam de espessamentos conhecidos como cristas
13 gonadais formadas no terço médio dos ductos mesonéfricos. As células
14 germinativas primordiais presentes no embrião migram do endoderma do saco
15 vitelínico para as cristas gonadais. Em seguida, inicia-se a diferenciação gonadal, e
16 estas células passam a ser denominadas oogônias (fêmeas) ou espermatogônias
17 (machos; NAVES et al., 2008).

18 As gônadas fetais são elipsoidais e as células intersticiais representam mais
19 de dois terços do ovário fetal produzindo o precursor de estrogênio materno. O
20 acentuado aumento das gônadas atinge pico por volta de 250 dias de gestação, e é
21 causada por hipertrofia e hipoplasia das células intersticiais. O mecanismo de
22 regressão do tamanho das gônadas fetais é devido às alterações degenerativas que
23 ocorrem nas células intersticiais (GINTHER, 1972).

24 Ono et al. (2015) realizaram um estudo com 122 ovários de potras entre 0-12
25 meses de idade com intuito de investigar o desenvolvimento pós-natal do ovário

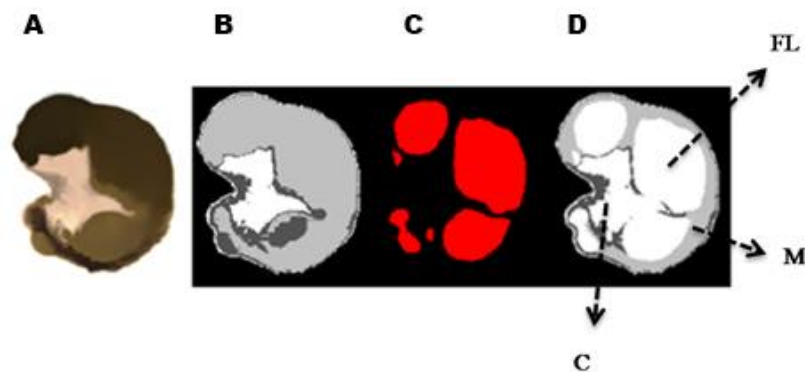
1 equino. Constataram que após o nascimento o tamanho dos ovários inicialmente
 2 diminuem devido à regressão medular associada com a degeneração das células
 3 intersticiais.

4 Por volta do terceiro mês de idade, Ono et al. (2015) descreveram a formação
 5 da fossa ovulatória bem como o início da inversão das camadas ovarianas medular
 6 e cortical. Estes eventos são seguidos pelo desenvolvimento de folículos antrais por
 7 volta de 6 a 7 meses de idade (Figura 3 e 4). A figura 5 ilustra a proporção do
 8 volume do ovário e das camadas cortical e medular de potras com 0-12 meses de
 9 idade. Portanto, os ovários da espécie equina são os únicos dentre as demais
 10 espécies que apresentam alterações morfológicas significativas desde a fase fetal
 11 até a puberdade.

12

13 **Figura 3.** A porção interna do ovário refere-se à região clara da imagem, e a
 14 camada exterior compete à região de coloração castanha. **A:** As regiões com cores
 15 castanha e clara delimitam as porções do ovário. **B:** A imagem foi dividida em três
 16 formas, na qual o córtex possui coloração branca e a medula está corada em cinza.
 17 **C:** As regiões correspondentes aos folículos apresentam-se em vermelho. **D:**
 18 Imagem composta de **B** e **C**.

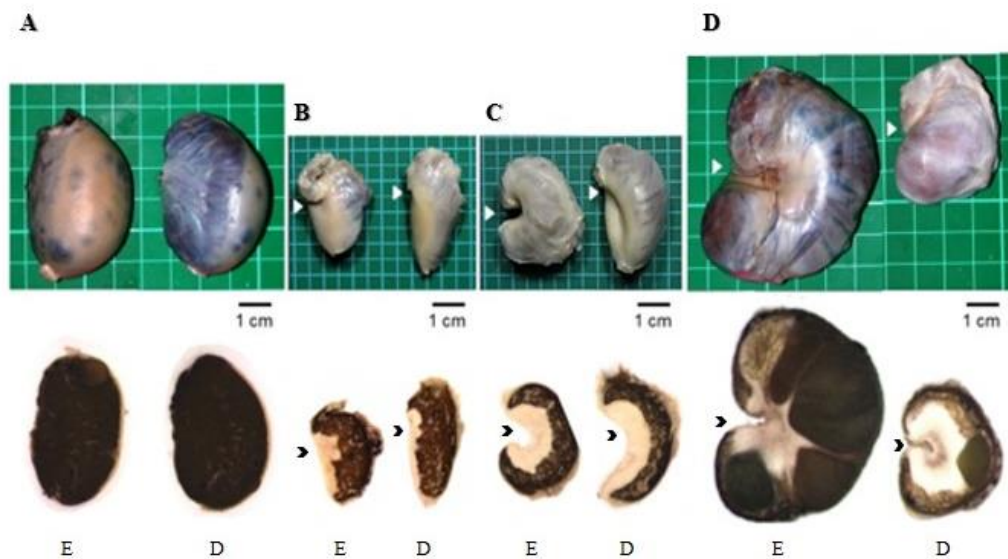
19 FL - folículo; C - córtex; M - medula.



20

21 **Fonte:** Adaptado Ono et al. (2015).

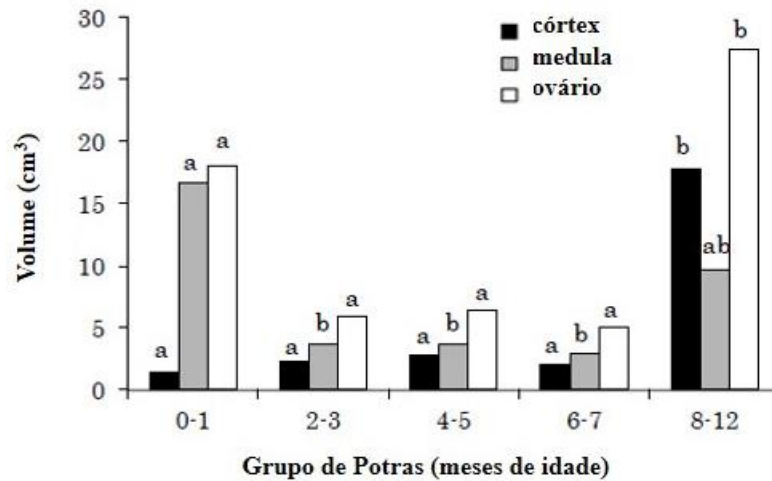
1 **Figura 4.** Alterações morfológicas do ovário equino ao longo dos primeiros 12
 2 meses de vida. **A:** Ovários de potras com 1 dia de idade, em que neste período, a
 3 maior parte do ovário é preenchido com a medula, e uma pequena parte refere-se à
 4 cortical. **B:** Ovários de potras com 110 dias de idade. As estruturas medulares
 5 apresentam-se mais evidentes na superfície do ovário, e ocorre a formação da fossa
 6 ovulação (ponta de seta), identificada pela primeira vez em potras de 3 meses de
 7 idade. **C:** Ovários de potras com 211 dias de idade. A visualização do formato
 8 característico da fossa de ovulação ocorre a partir dos 6 meses de idade. **D:** Ovários
 9 de potras com 351 dias de idade. Pode-se observar a presença de folículos com
 10 diversos diâmetros. D - direito; E - esquerdo.



11

12 **Fonte:** Adaptado Ono et al. (2015).

- 1 **Figura 5.** Proporção do volume do córtex, medula e ovários de potras com idade
2 entre 0-12 meses.



3

4 **Fonte:** Adaptado Ono et al. (2015).

5

6 **2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NAS ESPÉCIES MAMÍFERAS**

7

8 As células pluripotentes são destinadas, dentre as diversas funções, a originar
9 as células germinativas primordiais, nos quais são reconhecidas pela primeira vez
10 no epiblasto proximal. Assim, essas células migram da região extraembrionária
11 posterior para a linha primitiva, remetendo à mesoderme extraembrionária, próximo
12 ao local de origem da cavidade exocelômica (MCLAREN, 2003).

13 Dentre estas células, algumas passam a situar-se na base de
14 desenvolvimento do alantoide, sendo compreendidas como as células germinativas
15 primordiais (CGPs). Conforme é iniciado pela endoderme à invaginação para
16 formação do intestino posterior, as CGPs são carregadas com a endoderme ao longo
17 do comprimento intestinal. Portanto, devido à natureza da invaginação da
18 endoderme, as CGPs são situadas inicialmente no aspecto ventral do intestino

1 posterior, nos quais migram dorsalmente em torno do intestino e após lateralmente à
2 crista genital (MCLAREN, 2003).

3 A gônada embrionária desenvolve-se a partir da crista germinal, que possui
4 origem mesodérmica intermediária, localizada medialmente aos mesonefros
5 (LANGMAN, 1981). Após a chegada das células germinativas na gônada indiferente,
6 cordões sexuais primitivos provenientes do epitélio celômico crescem no
7 mesênquima subjacente, invadindo a região cortical e medular. Assim, a
8 diferenciação em ovários ou testículos é dependente do genótipo do tecido
9 embrionário gonadal (ADAMS; MCLAREN, 2002).

10 Dentre as CGPs, as que atingem as cristas gonadais, essas sobrevivem.
11 Porém, aquelas que permanecem em tecidos e órgãos vizinhos sofrem apoptose,
12 independente da fase de desenvolvimento (MCLAREN, 2001; ZAMBONI;
13 UPADHYAY, 1983). Assim, sugere-se que ocorra o processo fisiológico de
14 apoptose, em defesa à formação de células neoplásicas que sofrem influência dos
15 fatores de crescimento (DE FELICI et al., 2005). A cronologia das etapas de
16 diferenciação das gônadas em diferentes espécies mamíferas estão presentes na
17 Tabela 1.

Tabela 1. Cronologia das etapas de diferenciação das gônadas em várias espécies de mamíferos (dias após a concepção).

Espécies	Bovina	Ovina	Suína	Equina	Canina	Felina	Murina
Células germinativas gonadais	<35	30-32	20	21	28	—	—
Diferenciação sexual da gônada	26	40	52	60	28	28	9
Desenvolvimento das oogônias	57	43	28	—	—	—	—
Início da meiose	70-82	55-60	40-70	73-90	Ao nascimento	40-50	10
Primeiros folículos primordiais	90	66	64	—	3	11 após nascimento	—
Término da mitose nas oogônias	160	82	100	—	15-17 dias após nascimento	8 dias após nascimento	—
Primeiros folículos primários	140	95	—	—	—	—	—
Primeiros folículos secundários	210	103	—	—	60 dias após nascimento	—	—
Primeiros folículos terciários	230	150	—	Ao nascimento	6 meses após nascimento	—	—
Gestação	280	150	115	336	62	63	20

A tabela contém dados combinados de ADAMS et al., 2008; LATSHAW, 1987; RUSSE; SINOWATZ, 1991; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005.

1 As células germinativas primordiais permanecem com essa nomenclatura até
2 atingirem a crista gonadal (BYSKOV; NIELSEN, 2010) e após o marco do início da
3 divisão mitótica são renomeadas como oogônias. E assim, as oogônias são
4 denominadas como oócitos somente no início da meiose.

5 Conforme as oogônias chegam às gônadas, concomitante ao final de
6 sucessivas mitoses, ocorre a formação dos grupos de oogônias. Essas permanecem
7 ligadas por processos citoplasmáticos, também conhecidos como cistos ou ninhos
8 germinativos (PEPLING, 2006).

9 Esta proliferação mitótica foi observada até 7,5 meses de gestação em vacas,
10 no qual o número de oócitos por feto é estimado em aproximadamente 2 milhões
11 (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em camundongos, as oogônias necessitam de 4
12 ciclos mitóticos para que após ocorra a meiose (GOSDEN, 1995).

13 Portanto, a multiplicação mitótica é fundamental para o estabelecimento da
14 futura população de oócitos. O equilíbrio entre a produção e apoptose das oogônias
15 determina o número de oócitos disponíveis para a vida reprodutiva da fêmea
16 mamífera (AITKEN et al., 2011). A sinalização para o término da mitose e início da
17 meiose não é clara, porém sugere-se uma associação com a presença de ácido
18 retinóico proveniente dos mesonefros (BOWLES; KOOPMAN, 2007; CHILDS et al.,
19 2011).

20

21 **2.2.1 DIVISÃO MEIÓTICA**

22

23 Nos bovinos, a divisão meiótica das oogônias inicia-se 70 dias após a
24 concepção, em que o período de síntese do DNA ocorre em torno de 75-80 dias
25 (ADAMS et al., 2008). As células germinativas permanecem na fase de diplóteno da

1 prófase (primeira divisão meiótica) por 140 a 170 dias (ADAMS et al., 2008; BAKER;
2 HUNTER, 1978), e passam a ser denominadas de oócitos primários.

3 Nos oócitos não atrésicos, a meiose é retomada após o início da puberdade e
4 imediatamente antes da ovulação, dando origem ao oócito secundário com apenas
5 um cromossoma (FAIR, 2003). Sugere-se, que em fêmeas com períodos longos de
6 gestação (i.e., >40 dias), ocorra atraso no início da meiose e diferenciação das
7 gônadas. Além disso, as células blastemais (pré-granulosa) tornam-se ativas e
8 proliferam-se, permitindo assim que mais células germinativas sejam incorporadas
9 futuramente nos folículos (LATSHAW, 1987).

10 Portanto, sugere-se que o período no qual as oogônias permanecem em
11 meiose seja prolongado conforme o maior tempo gestacional, assim como em:
12 ovelhas 52-82 dias, porcas 40-100 dias, vacas 70-170 dias, macacas 70-140 dias e
13 na mulher 82-160 dias. Em hamster, coelha, doninha e na cachorra o início da
14 meiose é pós-natal (DEANESLY, 1977). A duração da fase meiótica de prófase
15 desde seu início até o momento de quiescência é estimado em cerca de uma
16 semana na camundonga, rata e hamster. Na coelha, cachorra, macaca, porca e
17 mulher ocorre entre 12-15 dias (DEANESLY, 1977). Tais informações não foram
18 encontradas para espécie equina.

19

20 **2.2.2 FORMAÇÃO DA RESERVA FOLICULAR OVARIANA**

21

22 As células epiteliais celômicas originárias dos mesonefrons dão origem aos
23 cordões sexuais primitivos e também ao epitélio da superfície do ovário (SAWYER et
24 al., 2002). Os cordões sexuais primitivos são designados como corticais, quando
25 identificados na periferia e cordões medulares, mantendo-se internamente. Sabe-se

1 que no ser humano, os cordões corticais desenvolvem-se e os cordões medulares
2 regridem com 7 semanas de gestação (LANGMAN, 1981). Os ductos genitais
3 também são de origem mesonéfrica, no qual parte destes formam o ovário
4 rudimentar na fêmea (*rete ovarii*; SWEENEY, 1998).

5 O contato entre os oócitos primários na crista gonadal e as células da pré-
6 granulosa, estimulam a formação da lâmina basal ao longo do seu contato com as
7 células mesenquimais dos ovários imaturos. Deste modo, os cordões são formados
8 por ovígeros, que consistem em oócitos associados às células da pré-granulosa
9 (SAWYER et al., 2002; ZAMBONI, 1982),

10 As células da pré-granulosa estão envolvidas em processos citoplasmáticos,
11 visto que conferem à membrana plasmática do oócito o estabelecimento da lâmina
12 basal. Com o estabelecimento das células da granulosa envolvendo o oócito
13 (PEPLING, 2012), é possível identificar a formação do folículo primordial, no qual
14 seu oócito permanece em estágio de quiescência (PEPLING, 2006). Tais eventos
15 são descritos em mulheres (FADDY; GOSDEN, 1995), ovelhas (LUNDY et al., 1999),
16 ratazanas (OKTAY, 1995; MEREDITH et al., 2000), vacas (WANDJI et al., 1996;
17 VAN WEZEL; RODGERS, 1996), fêmeas babuínas (WANDJI et al., 1997) e nas
18 macacas (NICHOLS et al., 2005). Assim, os oócitos que não se conectaram nas
19 células da pré-granulosa culminam no processo de degeneração (PICTON, 2001).
20 Tal fato, ocorre em cerca de 90% das células germinativas do ovário fetal bovino,
21 sugerindo desse modo que o ambiente do ovário controla o progresso através da
22 meiose (OKTEM; URMAN, 2010).

23 Durante o processo de oogênese em todas as espécies, incide um pico na
24 quantidade de células germinativas no momento de transição da divisão mitótica
25 para meiótica (REYNAUD; DRIANCOURT, 2000). Este pico no número de células

1 germinativas ocorre após a fecundação, e pode ser constatado no dia 13 (D13) na
2 espécie murina, D80 em bovinos e D110 na mulher. O número de células
3 germinativas diminui acentuadamente, devido à perda dessas, durante os eventos: i)
4 meiótico na fase de paquíteno (recombinação) do oócito e ii) formação dos folículos
5 primordiais (AITKEN et al., 2011; REYNAUD; DRIANCOURT, 2000). A morte dessas
6 células por apoptose, nos eventos citados, podem estar associados com os fatores
7 anti-apoptóticos (família das proteínas BCL2, o fator de crescimento de fibroblastos
8 [FGF], fator inibidor de leucócitos [LIF] e fatores pró-apoptóticos (Proteína Bax, fator
9 de crescimento transformador-beta [TGF- β]; AITKEN et al., 2011).

10 A elucidação sobre a causa da grande perda precoce de oócitos recém-
11 formados ainda permanece incompreendido. Contudo, estudiosos propõem
12 hipóteses sobre as causas de esgotamento, assim como: i) a morte para remover
13 oócitos com defeitos morfológicos ou de baixa qualidade (PEPLING; SPRADLING,
14 2001); ii) a morte individual de oócitos para permitir que as células da pré-granulosa
15 penetrem nos oócitos restantes (PEPLING; SPRADLING, 2001); iii) a morte das
16 células da pré-granulosa de oócitos, causada por células protetoras dos oócitos
17 vizinhos, e iv) a morte por negligência, em que oócitos não recebem os estímulos
18 necessários locais ou suporte das células somáticas (TILLY, 2001). A mais elevada
19 taxa de sobrevivência das células germinativas em mamíferos domésticos é
20 encontrada na espécie suína, constatando que a metade do número de células
21 germinais sobrevivem até o nascimento (MCGEADY et al., 2006). A tabela 2
22 apresenta o número de folículos presentes na reserva folicular ovariana de várias
23 espécies ao longo da vida.

Tabela 2. Número de folículos primordiais no ovário de mamíferos em diferentes idades (ou número de oócitos durante a gestação).

Idade ou fase da gestação	Camundonga (a)	Rata (b)	Cachorra (c)	Gata (d)	Ovelha (e)	Égua (f)	Vaca (g)	Mulher (h)
Pico de células germinativas	250x10 ³ (i)	50-75x10 ³	—	—	9x10 ⁶ (75dias)	—	2,7x10 ⁶ (110dias)	7x10 ⁶ (5meses)
Início da gestação							16x10 ³ (50dias)	
Terço médio da gestação					200x10 ³ (90dias)		107x10 ³ (170dias)	
Terço final da gestação					82x10 ³ (135dias)		68x10 ³ (240dias)	
Nascimento	7.924	10-15x10 ³ (j)	700x10 ³		82x10 ³ (j)		135x10 ³ (j)	1,5x10 ⁶
Período neonatal	1.987(7dias)	924(4-5meses)	350x10 ³		27.018(y)		—	—
Puberdade	—	5.180(d)	150.380(d)	74.520	30-50x10 ³	35.950	120x10 ³ (o)	300x10 ³
Maturidade adulta	254(220dias)	—	500	—	10.915(k)	—	3x10 ³ (l)	—
Período máximo reprodutivo em anos (m)	—	—	9	14	16-18	25	25	42
Período máximo de vida em anos (m)	—	—	15	20	19	25	30	77+

a (KERR et al., 2006); b (MEREDITH et al., 2000); c (MCGEADY et al., 2006); d (GOSDEN; TELFER, 1987); e (GONDOS, 1978); f (DRIANCOURT et al., 1982); g (MCGEADY et al., 2006); h (FADDY et al., 1992); i (TAM; SNOW, 1981); j (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005); k (DRIANCOURT et al., 1985); l (SPICER; ECHTERNKAMP, 1986); m (COHEN, 2004).

2.2.3 QUESTÕES SOBRE A RESERVA FOLICULAR OVARIANA

Nas espécies mamíferas é sabido que há um *pool* de folículos primordiais contendo todos os oócitos necessários para a vida reprodutiva das fêmeas (PICTON, 2001). Além disto, esta reserva folicular é formada durante a vida fetal, sendo que os folículos encontram-se presentes no ovário ao nascimento (GOSDEN, 2004; ZUCKERMAN, 1951). Nas fêmeas das espécies bovina, ovina e suína, os folículos localizam-se distribuídos aleatoriamente no córtex ovariano (região externa), enquanto nas espécies canina e felina apresentam-se de forma aglomerada (MCGEADY et al., 2006).

O estudo do processo da oogênese nos mamíferos foi proposto a cerca de 50 anos atrás, no qual constataram que para a maioria das espécies este processo segue um padrão uniforme. Atualmente há dois conceitos sobre a definição do *pool* folicular (BUKOVSKY et al., 2005), tais como:

- i) A oogênese pode ocorrer continuamente ou ciclicamente, ao longo da vida reprodutiva. Tal fato foi verificado na maioria dos teleósteos, em todos os anfíbios e na maioria dos répteis. Nos mamíferos, os lêmures apresentam na vida adulta a persistência de oogônias (GOSDEN, 1995).
- ii) A oogênese ocorre apenas em gônadas fetais ou neonatais, não ocorrendo a persistência das oogônias durante a maturidade sexual. Tal fato cabe aos ciclóstomos, alguns teleósteos, alguns répteis, todas as aves, os monotremados e com poucas exceções à todos os mamíferos (FRANCHI et al., 1962).

1 Recentemente, o conceito sobre a neofoliculogênese tem sido estudado na
2 espécie murina (JOHNSON et al., 2004) e humana (TILLY; TELFER, 2009; WHITE
3 et al., 2012). Johnson et al. (2004) descreveram a presença de marcadores
4 específicos de meiose nos ovários de camundongas adultas. Este mesmo grupo de
5 pesquisadores promoveu a esterilização química de camundongas detectando a
6 ausência de população folicular ovariana. Em seguida, as mesmas foram
7 submetidas à transfusão de medula óssea e sangue periférico. Uma semana depois,
8 encontraram folículos viáveis nos ovários destes animais (JOHNSON, 2005).

9 De Felici (2010) sugere que linhagens de células germinativas estejam
10 presentes no córtex ovariano ou ainda que ocorra a migração de células
11 mesenquimais. Além deste estudo, muitos outros tentaram confirmar ou refutar a
12 hipótese de Jhonson (2005); contudo, ainda não existe nenhuma confirmação
13 relacionada à oogênese pós-natal.

14

15 **2.2.4 ATIVAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS** 16 **FOLÍCULOS OVARIANOS**

17

18 O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um
19 processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* da reserva, ainda
20 quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário
21 e pré-ovulatório; RUSSE, 1983).

22 O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da
23 proliferação das células da granulosa. Nesse processo, os folículos primordiais
24 gradualmente adquirem células da granulosa de formato cúbico, tornando-se
25 folículos de transição, caracterizados pela presença de células da granulosa com

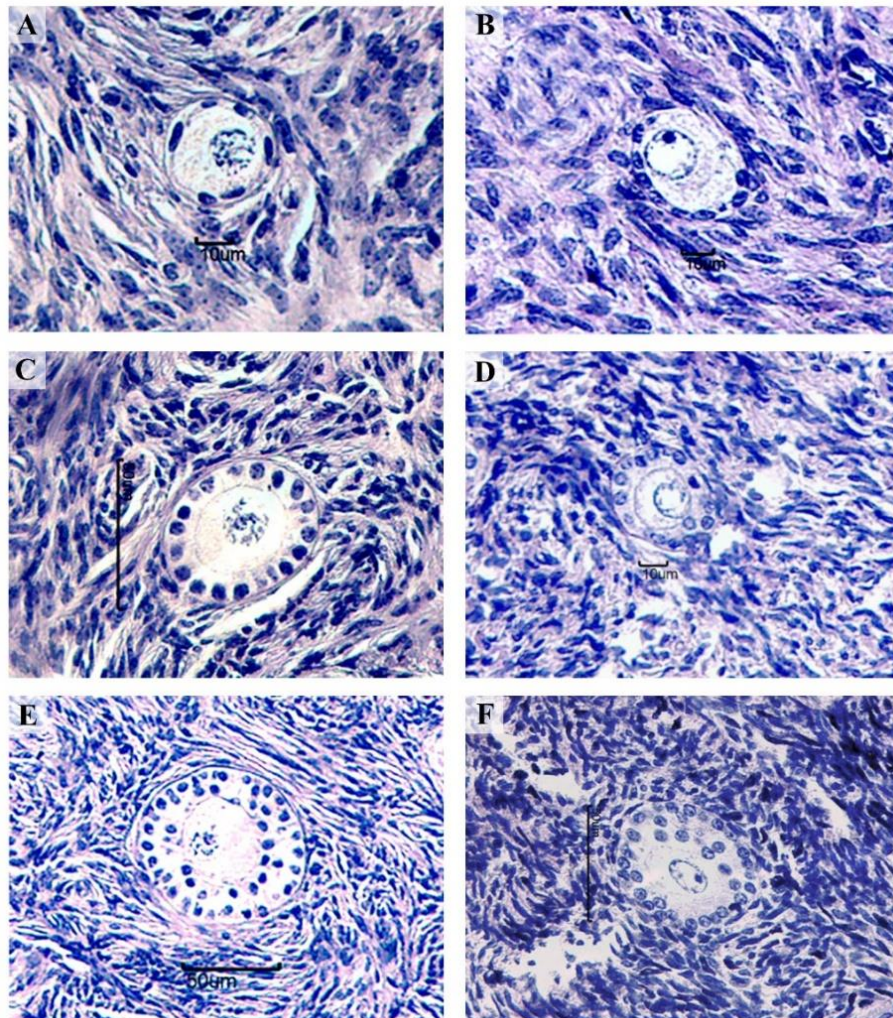
1 ambos os formatos: pavimentoso e cúbico. Em seguida, define-se como folículo
2 primário, aquele que possui uma camada completa de células da granulosa de
3 formato cúbico (GOUGEON, 2010).

4 Além da alteração no formato das células da granulosa, o diâmetro
5 citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (HIRSHFIELD,
6 1991). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais,
7 bem como os mecanismos envolvidos na variação do período de início do
8 crescimento folicular são ainda enigmáticos e representam uma das maiores
9 questões relacionadas à biologia ovariana (FORTUNE et al., 2000).

10 Uma característica notável dos folículos primários é a presença de uma zona
11 pelúcida, formada por glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que circunda o oócito.
12 Assim, os folículos secundários apresentam duas a três camadas de células da
13 granulosa e células da teca em torno da membrana basal (RANKIN et al., 2000).
14 Neste estágio, as células da granulosa apresentam uma extensiva rede de junções
15 do tipo gap, ou seja, canais membranários que permitem a passagem de nutrientes,
16 íons inorgânicos e pequenos metabólitos entre as células (KIDDER; MHAWI, 2002;
17 Figura 6).

18 No próximo estágio da foliculogênese, os folículos passam a ser
19 denominados terciários ou antrais, já que a organização das células da granulosa
20 encontra-se em várias camadas, além da formação de uma cavidade repleta de
21 líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro. O
22 fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas
23 séricas e alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da
24 granulosa (BARNETT et al., 2006).

- 1 **Figura 6.** Folículos pré-antrais da espécie equina (B, D e F) e bovina (A, C e E).
 2 Folículos Primordiais A e B; Primários C e D; Secundários E e F. Coloração PAS e
 3 Hematoxilina. Aumento 40x.



4 2.2.5 ATRESIA FOLICULAR

5

6 Dentre a totalidade dos folículos ovarianos, apenas uma pequena parcela
 7 culminam até a ovulação, o restante desses folículos passam por um processo
 8 apoptótico, denominado atresia (MARKSTROM et al., 2002). A atresia folicular não é
 9 igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento folicular
 10 (FORTUNE, 1994). É um processo fisiológico, de duração desconhecida, que parece

1 ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados até a
2 ovulação. A duração precisa, bem como o estágio no qual os folículos ovarianos são
3 mais susceptíveis à atresia, não são conhecidos (HENDERSON et al., 1987).

4 O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais
5 (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as
6 primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo,
7 retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o
8 processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos nesta fase de
9 desenvolvimento (MORITA; TILLY, 1999).

10 Em folículos pré-antrais, alterações nas células da granulosa são raramente
11 observadas (JORIO et al., 1991). É importante ressaltar que após a formação da
12 cavidade antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da
13 granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as
14 primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa.
15 O aparecimento de células da granulosa com núcleos picnóticos, condensação da
16 cromatina e retração nuclear, pode ser considerado como os primeiros sinais
17 morfológicos de atresia, que é observado predominantemente em células da
18 granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de
19 núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral
20 (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996).

21 Com a progressão da atresia, observa-se redução no número de camadas
22 das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após
23 estas drásticas mudanças na camada granulosa, o oócito frequentemente, sofre
24 pseudomaturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais
25 de atresia (BYSKOV, 1974).

1 Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o
2 número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, conseqüentemente, a
3 produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO
4 et al., 2002).

5

6 **2.3 HISTOLOGIA CLÁSSICA**

7

8 A histologia clássica proporciona o estudo tecidual de todos os sistemas do
9 organismo, possibilitando o detalhamento estrutural e reconhecimento dos mesmos.
10 Os componentes estruturais que formam os tecidos são a matriz extracelular e as
11 células. Tal interação exerce funções nas quais remetem apoio mecânico às células,
12 assim como o transporte de nutrientes, produção e secreção de metabólicos
13 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

14 Os cortes histológicos são os modelos frequentemente utilizados para a
15 análise por microscopia óptica. Para tanto, as estruturas devem se manter íntegras
16 por longos períodos de tempo através de substâncias responsáveis pela fixação
17 celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

18 A fixação química demonstra resultados satisfatórios para os tecidos
19 ovarianos das diversas espécies mamíferas. Nosso grupo de estudo investigou três
20 diferentes fixadores para tecido ovariano da espécie equina, tais quais: Carnoy,
21 Bouin e Formol 10%. O Carnoy foi o fixador que proporcionou melhor conservação
22 das estruturas sem causar danos estruturais aos folículos presentes no tecido
23 ovariano (BÚFALO et al., 2015; Apêndice 7).

24 Para os estudos com microscopia de luz, os cortes histológicos devem prover
25 de coloração para que seja possível a visualização dos componentes presentes no

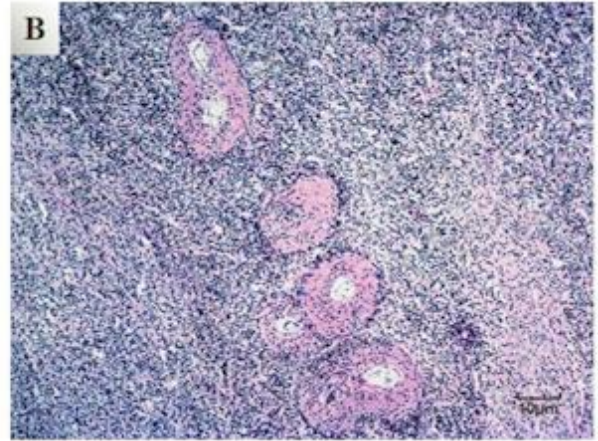
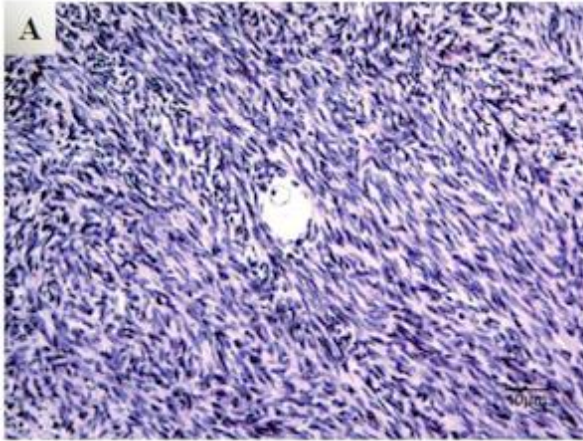
1 tecido, células e matriz extracelular. Os corantes utilizados comportam-se como
2 substâncias ácidas ou básicas e tendem a formar uma ligação eletrostática com o
3 tecido. Dentre os corantes comumente empregados a hematoxilina consiste em uma
4 substância de coloração azul ou violeta, demarcando o núcleo e outras estruturas
5 celulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

6 Esta técnica é aplicada rotineiramente no estudo da foliculogênese de
7 espécies mamíferas, visto que permite a visualização dos folículos pré-antrais e
8 antrais no tecido ovariano. Assim, com a observação morfológica das células da
9 granulosa e oócito, os folículos ovarianos podem ser classificados de acordo com o
10 estágio de desenvolvimento. Tal recurso é utilizado como método de avaliação do
11 cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos, com intuito de quantificar a ativação da
12 população folicular pré-antral contida na reserva do ovário (ALVES et al., 2015;
13 GOMES et al., 2015).

14 A histologia clássica tem sido empregada para a avaliação morfológica dos
15 folículos pré-antrais em diversas espécies, tais como: caprina (MATOS et al., 2007),
16 bovina (ANDRADE et al., 2012), equina (GOMES et al., 2015) e humana (ABIR et
17 al., 2010).

18 Esta técnica conta com o auxílio do microscópio óptico para identificar os
19 folículos em crescimento, e ainda proporciona a obtenção de parâmetros
20 morfológicos relacionados ao tamanho do oócito, formato das células da granulosa e
21 teca. Possibilita, ainda, a observação de alterações degenerativas, como retração ou
22 vacúolos citoplasmáticos, a presença ou ausência de núcleos picnóticos, o
23 rompimento das células da granulosa, bem como a baixa densidade celular
24 (GOMES et al., 2015; ALVES et al., 2015; Figura 7).

- 1 **Figura 7.** Ilustrações histológicas do tecido ovariano equino. (A) tecido ovariano
2 interno com a presença de folículo primordial e (B) tecido ovariano externo com
3 presença de vasos sanguíneos. Coloração PAS e Hematoxilina. Aumento 20x.



1 REFERÊNCIAS

- 2 ABIR, R.A.O.A.; ZHANG, X.Y.; GAROR, R.; NITKE, S.; FISCH, B. Vascular
3 endothelial growth factor A and its two receptors in human preantral follicles from
4 fetuses, girls, and women. **Fertility Sterility**, v.93, p.2337-47, 2010.
- 5
6 ADAMS, I.R.; MCLAREN, A. Sexually dimorphic development of mouse primordial
7 germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. **Development**, v.129,
8 p.1155-1164, 2002.
- 9
10 ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding
11 ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80, 2008.
- 12
13 AITKEN, R.J.; FINDLAY, J.K.; HUTT, K.J.; KERR, J.B. Apoptosis in the germ line.
14 **Reproduction**, v.141, p.139-150, 2011.
- 15
16 ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ROCHA, C.D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R.F.F.;
17 GASTAL, M.O.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI,
18 M.L.; GASTAL, E.L. Number and density of equine preantral follicles in diferente
19 ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v.83, p.1048-1055, 2015.
- 20
21 ANDRADE, E.R.; MARCONDES, S.M; ALFIERI, A.A.; FREDERICO, R.L.B.A.P.;
22 FIGUEIREDO, J.R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture
23 of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p.1104–13, 2012.
- 24
25 BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A.
26 Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**,
27 v.10, p.1-19, 2006.
- 28
29 BAKER, T.G.; HUNTER, R.H.F. Oogenesis and follicular growth in the cow:
30 implications for superovulation. In: **Control of Reproduction in the Cow**.
31 Luxembourg: CEC publications, 1978.
- 32
33 BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO,
34 S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. 2003.
- 35
36 BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals.
37 **Development**, v.134, p.3401-3411, 2007.
- 38
39 BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.G.; BERGAMO, L.Z.;
40 COSTA, C.B.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Effect of fixative type and fixation
41 time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências**
42 **Agrárias**, 2015 [Epub ahead of print].
- 43
44 BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M.; WIMALASENA, J.; AYALA, M.
45 E.R.D. Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. **Endocrine**
46 **Reviews**, v.26, p.301-316, 2005.
- 47
48 BYSKOV, A.G.S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary.
49 **Journal Reproduction Fertility**, v.37, p.277-85, 1974.

- 1
2 BYSKOV, A.G.; NIELSEN, M. Ontogeny of the mammalian ovary. In **Biology and**
3 **Pathology of the Oocyte** (ed. A. O. Trounson & R. G. Gosden). Cambridge:
4 Cambridge University Press, 2010.
- 5 CHILDS, A.J.; COWAN, G.; KINNELL, H.L.; ANDERSON, R.A.; Saunders, P.K.
6 Retinoic acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad.
7 **Plos One**, v.6, e20249, 2011.
- 8
9 COHEN, A.A. Female post-reproductive lifespan: a general mammalian trait.
10 **Biological Reviews**, v.79, p.733-750, 2004.
- 11
12 DEANESLY, R. Germ cell proliferations in the fetal horse ovary. **Cell and Tissue**
13 **Research**, v.185, p.361-371, 1977.
- 14
15 DE FELICI, M.; KLINGER, F.G.; FARINI, D.; SCALDAFERRI, M.L.; IONA, S.;
16 LOBASCIO, M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ
17 cell proliferation and oocyte programmed cell death. **Reproductive Biomedicine**
18 **Online**, v.10, p.182-191, 2005.
- 19
20 DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J.C.; PALMER, E. Ovarian
21 follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction Nutrition and**
22 **Development**, v.22, p.1035-1047, 1982.
- 23
24 DRIANCOURT, M.A.; CAHILL, L.P.; BINDON, B.M. Ovarian follicular populations and
25 preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. **Journal of**
26 **Reproduction and Fertility**, v.73, p.93-107, 1985.
- 27
28 ENDERS, A.C.; BUCHANAN, G.D. The reproductive tract of the female nine-banded
29 armadillo. **Texas Reports on. Biology and Medicine**, v.17, p.323-340, 1957.
- 30
31 EVANS, T.J.; CONSTANTINESCU, G.M.; GANJAN, V.K. Clinical reproductive
32 anatomy and physiology of the mare. In: YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, W.R.
33 **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2 ed, p.47-67, 2007.
- 34
35 FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G.; GOUGEON, A.; RICHARDSON, S.J.; NELSON, J.F.
36 Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting
37 menopause. **Human Reproduction**, v.7, p.1342-1346, 1992.
- 38
39 FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. A mathematical model of follicle dynamics in the
40 human ovary. **Human Reproduction**, v.10, p.770-775, 1995.
- 41
42 FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence.
43 **Animal Reproduction Science**, v.78, p.203-216, 2003.
- 44
45 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIN, C. A. Manipulação de oócitos
46 inclusos em folículos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO,
47 J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São
48 Paulo, p.340, 2002.
- 49

- 1 FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology**
2 **Reproduction**, v.50, p.225-32, 1994.
3
- 4 FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHI, C.M.; KITO, S. The primordial to primary
5 follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.25, p.53-60, 2000.
6 FRANCHI, L.L.; MANDL, A.M.; ZUCKERMAN, S. **The ovary**: Academic Press:
7 London, 1962.
8
- 9 GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Equine assisted
10 reproduction and embryo technologies. **Animal Reproduction**, v.10, p.334-343,
11 2013.
12
- 13 GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental
14 competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging
15 from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell
16 nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.39–55.2007.
17
- 18 GETTY, R.; SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. **Anatomia dos Animais Domésticos**.
19 Editora Interamericana. 5ª ed. vol. 1. Rio de Janeiro, 1981.
20
- 21 GOSDEN, R.G. Follicular status at menopause. **Human Reproduction**, v.2, p.617-
22 621, 1987.
23
- 24 GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects.
25 2.ed. Cross Plaines: Equiservices, p.397-403, 1992.
26
- 27 GOMES, R.G.; LISBOA, L.A.; SILVA, C.B.; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA,
28 R.L.; GONZALEZ, S.M.; SANTOS, M.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.S.R.;
29 SENEDA, M.M. Improvement of development of equine preantral follicles after six
30 days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation, **Theriogenology**, v.84,
31 p.750-755, 2015.
32
- 33 GONDOS, B. Oogonia and oocytes in mammals. In **The Vertebrate Ovary** (ed. R. E.
34 Jones). New York: Plenum Press, 1978.
35
- 36 GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.G.; BÚFALO, I.; MACHADO,
37 F.Z.; BUENO, J.V.R.; SCARPIN, L.C.; BERGAMO, L.Z.; SILVA-SANTOS, K.C.;
38 MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Recovery of equine oocytes by scraping of the
39 follicular wall with different specifications of needles and morphological analysis of
40 cumulus oophorus. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n. 6, 2015 [Epub ahead of
41 print].
42
- 43 GOSDEN, R.G. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a
44 testis? **Human Reproduction Update**, v.10, p.193-195, 2004.
45
- 46 GOSDEN, R. Oocyte development through life. In **Gametes: The Oocyte** (ed. G.
47 Yovich): Cambridge Reviews in Human Reproduction, 1995.
48

- 1 GOUGEON, A. The early stages of follicular growth. In **Biology and Pathology of**
2 **the Oocyte** (ed. A. O. Trounson & G. R. G). Cambridge: Cambridge University
3 Press, 2010.
- 4
5 HAAG, K.T.; MAGALHAES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.;
6 GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L.
7 Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the
8 Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v.79, p.599–609, 2013a.
- 9
10 HAAG, K.T.; MAGALHAES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.;
11 GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro
12 culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method.
13 **Theriogenology**, v.79, p.911-917, 2013b.
- 14
15 HAFEZ, E.S.E. Anatomy of female reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in**
16 **farm animals**, 6. ed. USA: Williams & Wilkins. p.20-58, 1996.
- 17
18 HENDERSON, K.M.; MC NATTY, K.P.; SMITH, P.; GIBB, M.; O'KEEFFE, L.E.; LUN,
19 S.; HEATH, D.A.; PRISK, M.D. Influence of follicular health on thesteroidogenic and
20 morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of**
21 **Reproduction Fertility**, v.79, n.1, p.333-43, 1987.
- 22
23 HINRICHS, K. In vitro production of equine embryos: state of the art. **Reproduction**
24 **in Domestic Animal Supplement**, v.45, p.3–8, 2010.
- 25
26 HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International**
27 **Review of Cytology**, v.124, p.43-101, 1991.
- 28
29 HUGHES, M.H.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis
30 (programed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism
31 underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v.129, p.2415-422, 1991.
- 32
33 JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, L. Germline stem cells
34 and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150,
35 2004.
- 36
37 JOHNSON, J. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells
38 in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.
- 39
40 JORIO, A.; MARIANA, J.C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of
41 ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal**
42 **Reproduction Science**, v.26, p.239-50, 1991.
- 43
44 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 2 ed – Rio de Janeiro.
45 Guanabara Koogan, p. 524, 2008.
- 46
47 KERR, J.B.; DUCKETT, R.; MYERS, M.; BRITT, K.L.; MLADENOVSKA, T.;
48 FINDLAY, J.K. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse
49 ovary: evidence for
50 maintenance of primordial follicle supply. **Reproduction**, v.132, p.95-109, 2006.

- 1
2 KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis.
3 **Reproduction**, v.123, p.613, 2002.
- 4 LANGMAN, J. **Medical Embryology: Williams and Wilkins**, 1981.
- 5
6 LATSHAW, W.K. **Veterinary developmental anatomy: Decker Incorporated**, 1987.
- 7
8 LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N.L.; MCNATTY, K.P.
9 Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of**
10 **Reproduction and Fertility**, v.115, p.251-262, 1999.
- 11
12 MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H.
13 Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation.
14 **Reproduction**, v.23, p.23-30, 2002.
- 15
16 MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas
17 para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro.
18 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.433-42, 2007.
- 19
20 MCLAREN, A. Mammalian germ cells: birth, sex, and immortality. **Cell structure and**
21 **function**, v.26, p.119-122, 2001.
- 22
23 MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. **Developmental Biology**, v.262,
24 p.1-15, 2003.
- 25
26 MCGEADY, T.A.; QUINN, P.J.; FITZPATRICK, E.S.; RYAN, M.T. Male and Female
27 Reproductive Systems. In **Veterinary Embryology: Blackwell Publishing**, 2006.
- 28
29 MEREDITH, S.; DUDENHOEFFER, G.; JACKSON, K. Classification of small type
30 B/C follicles as primordial follicles in mature rats. **Journal of Reproduction and**
31 **Fertility**, v.119, p.43-48, 2000.
- 32
33 MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.
34 **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.
- 35
36 NAVES, C.S.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; BELLETI, M.E.;
37 OLIVEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem
38 raça definida. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.416-422, 2008.
- 39
40 NICHOLS, S.M.; BAVISTER, B.D.; BRENNER, C.A.; DIDIER, P.J.; HARRISON,
41 R.M.; KUBISCH, H.M. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*).
42 **Human Reproduction**, v.20, p.79-83, 2005.
- 43
44 ONO, M.; AKUZAWA, H.; NAMBO, Y.; HIRANO, Y.; KIMURA, J.; TAKEMOTO, S.;
45 NAKAMURA, S.; YOKOTA, H.; HIMENO, R.; HIGUCHI, T.; OHTAKI, T.;
46 TSUMAGARI, S. Analysis of the equine ovarian structure during the first twelve
47 months of life by three-dimensional internal structure microscopy. **The Journal of**
48 **Veterinary Medical Science**, 2015 [Epub ahead of print].
49

- 1 OKTAY, K. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in
2 the rat. **Biology of Reproduction**, v.53, p.295-301, 1995.
- 3 OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Human**
4 **Reproduction**, v.25, p.2944-2954, 2010.
- 5
6 PEPLING, M.E.; SPRADLING, A.C. Mouse ovarian germ cell systs undergo
7 programmed breakdown to form primordal follicles. **Developmental Biology**, v.234,
8 p.339-351, 2001.
- 9
10 PEPLING, M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female
11 germ cell development. **Genesis**, v.44, p.622-632, 2006.
- 12
13 PEPLING, M.E. Follicular assembly: mechanisms of action. **Reproduction**, v.143,
14 p.139-149, 2012.
- 15
16 PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle.
17 **Theriogenology**, v.55, p.1193-1210, 2001.
- 18
19 RANKIN, T.; SOYAL, S.; DEAN, J. The mouse zona pellucida: folliculogenesis,
20 fertility and pre-implantation development. **Molecular and Cellular Endocrinology**.
21 v.163, n.1, p.21-25, 2000.
- 22
23 REYNAUD, K.; DRIANCOURT, M.A. Oocyte attrition. **Molecular and Cellular**
24 **Endocrinology**, v.163, p.101-108, 2000.
- 25
26 RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Anatomy**, v.24, p.77-92, 1983.
- 27
28 RUSSE, I.; SINOWATZ, F. **Lehrbuch der Embryologie der Haustiere**. Berlin,
29 Hamburg, 1991.
- 30
31 SAWYER, H. R.; SMITH, P.; HEATH, D.A.; JUENGEL, J.L.; WAKEFIELD, S.J.;
32 MCNATTY, K.P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep.
33 **Biology of Reproduction**, v.66, p.1134-1150, 2002.
- 34
35 SESSIONS-BRESNAHAN, D.R.; GRAHAM, J.K.; CARNEVALE, E.M. Validation of a
36 heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine
37 oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections.
38 **Theriogenology**, v.82, p.274-82, 2014.
- 39
40 SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. Ovarian follicular growth, function and turn over
41 in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.62, p.428-451, 1986.
- 42
43 SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Distribution, morphology and ultrastructure of
44 preantral follicles in the ovary of the mare. **Havemeyer Found Monogr Ser**, v.5,
45 p.33-35, 2002.
- 46
47 SWEENEY, L.J. **Basic Concepts in Embryology**. New York: The McGraw-Hill
48 Companies Health Professions Division, 1998.
- 49

- 1 TAM, P.P.; SNOW, M.H. Proliferation and migration of primordial germ cells during
2 compensatory growth in mouse embryos. **Journal of Embryology and**
3 **Experimental Morphology**, v.64, p.133-147, 1981.
- 4
- 5 TELFER, E.E.; WATSON ED. Method for isolating preantral follicles from mare
6 ovaries. **J Reproduction and Fertility Supplement**, v.56, p.447–453, 2000.
- 7
- 8 TILLY, J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature**
9 **Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.838-848, 2001.
- 10
- 11 TILLY, J.L.; TELFER, E.E. Purification of germline stem cells from adult mammalian
12 ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? **Molecular**
13 **Human Reproduction**, v.15, p.393-398, 2009.
- 14
- 15 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
16 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-
17 1751, 2005.
- 18
- 19 VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine
20 primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.55,
21 p.1003-1011, 1996.
- 22
- 23 ZAMBONI, L. The contribution of the mesonephros to the development of the sheep
24 fetal testis. **Developmental Dynamics**, v.165, p.339-356, 1982.
- 25
- 26 ZAMBONI, L.; UPADHYAY, S. Germ cell differentiation in mouse adrenal glands.
27 **Journal of Experimental Zoology**, v.228, p.178-193, 1983.
- 28
- 29 ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Progress in**
30 **Hormone Research**, v.6, p.63-108, 1951.
- 31
- 32 WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation in vitro of growth
33 of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.
- 34
- 35 WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E.
36 Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. **Human Reproduction**, v.12,
37 p.1993-2001, 1997.
- 38
- 39 WEIR, B.J.; ROWLANDS, I.W. Functional anatomy of the hystricomorph ovary.
40 **Symposia of the Zoological Society London**, v.34, p.303-332, 1974.
- 41
- 42 WHITE, Y.A.R.; WOODS, D.C.; KAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L.
43 Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive
44 age women. **Nature Medicine**, v.18, p.413-421, 2012.

3. HIPÓTESE

1

2

3 O ovário equino possui distribuição heterogênea de folículos pré-antrais
4 ovarianos, com maior presença de folículos nas regiões interna do ovário e próxima
5 à fossa ovulatória.

4. OBJETIVOS

1

2

4.1 OBJETIVO GERAL

4

- Determinar a distribuição regional de folículos pré-antrais em ovários equinos.

6

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

8

- Delimitar as regiões do ovário equino que contenham maior quantidade de folículos pré-antrais;

11

- Quantificar a presença de folículos ovarianos na extensão das regiões interna, média e externa do ovário equino;

14

- Quantificar a presença de folículos ovarianos nas regiões próximas e distantes da fossa ovulatória do ovário equino.

16

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

DISTRIBUIÇÃO REGIONAL E INTEGRIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM OVÁRIOS EQUINOS

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a distribuição dos folículos pré-antrais equinos no tecido ovariano, avaliando as regiões interna, média e externa do ovário, assim como as regiões próximas e distantes da fossa ovulatória. Ovários (n=7) foram obtidos de éguas com histórico desconhecido provenientes de abatedouro e armazenados em recipiente térmico (21° C) para transporte até o laboratório. Cada ovário foi dissecado e seccionado no plano sagital (curvatura maior) para obtenção de dois hemiovários. Os hemiovários foram fragmentados e fixados em Carnoy por 12 horas para processamento histológico. No experimento 1, utilizaram-se três ovários para investigação da distribuição folicular na região interna (C1), média (C2) e externa (C3) do ovário. No experimento 2, utilizaram-se quatro ovários para avaliar a localização folicular em regiões próximas (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória. A análise estatística para comparação dos dados foi realizada utilizando o teste Exato de Fisher, com nível de 5% de significância. No primeiro experimento foram avaliados 1.130 folículos, sendo 1.054 (93,27 %) folículos primordiais e 53 (4,69 %) folículos em desenvolvimento. No experimento 2 foram avaliados 938 folículos, 901 (95,30%) folículos primordiais e 37 (3,94 %) em

1 desenvolvimento. No experimento 1, houve diferença ($p < 0,05$) quanto a presença de
2 folículos pré-antrais nas regiões interna (C1 41,6 %; 470/1130), média (C2 32,4 %;
3 366/1130) e externa (C3 26 %; 294/1130) do ovário equino. Estas três regiões
4 diferiram quando comparadas entre si, porém a região C1 apresentou maior
5 percentagem de folículos pré-antrais em relação às demais ($p < 0,05$). No entanto, as
6 regiões C2 e C3 apresentaram maior percentagem de folículos íntegros primordiais
7 e em desenvolvimento que a região C1 ($p < 0,05$). No experimento 2, as regiões
8 próximas à fossa ovulatória (PFO1+PFO2; 58,7 %; 551/938) obtiveram maior
9 presença folicular que a região distante da fossa ovulatória (DFO3+DFO4; 41,3 %;
10 387/938; $p < 0,05$). Contudo, a região DFO apresentou menor proporção de folículos
11 degenerados primordiais e em desenvolvimento que a região PFO ($p < 0,05$). Desta
12 forma, a distribuição dos folículos pré-antrais no ovário equino ocorre de forma
13 heterogênea, apresentando maior presença de folículos pré-antrais nas regiões
14 interna e próxima da fossa ovulatória ($p < 0,05$). Este estudo sugere novos conceitos
15 quanto a localização dos folículos ovarianos na espécie equina, contribuindo na
16 aplicação de técnicas reprodutivas como o cultivo *in vitro*.

17

18 **Palavras-chave:** Égua, Folículos ovarianos, Fossa ovulatória, Localização folicular,
19 Região ovariana.

20

21

22

23

24

25

1 **Abstract**

2

3 The aim of this research is to define the concentration and distribution of the
4 equine preantral follicles in the ovarian tissue, evaluating the inner, middle and outer
5 regions of the ovary, as well as near and far regions of the ovulation fossa. The
6 ovaries (n=7) were obtained from slaughterhouse mares with unknown historic and
7 transported to the laboratory stored in cooler (21 ° C). Each ovary was dissected and
8 sectioned in the sagittal plane (greater curvature) to obtain two hemiovaries. The
9 hemiovaries were fragmented and fixed in Carnoy for 12 hours to histological
10 processing. In the experiment 1, three ovaries were used for the investigation of the
11 follicular distribution in the inner (C1), middle (C2) and outer (C3) regions. In the
12 experiment 2, four ovaries were used to evaluate the follicular localization in near
13 (PFO) and far (DFO) regions of the ovulation fossa. Statistical analysis for
14 comparison of data was performed using Fisher's exact test, with 5% level of
15 significance using the statistical software Minitab 16.1.1. 1130 follicles were found in
16 the first experiment, 1054 (93.27%) of these were primordial follicles, 53 (4.69%)
17 were developing follicles, and 93.71% of these had morphological integrity. In the
18 second experiment, 938 follicles were found, 901 (95.30%) of these were primordial
19 follicles and 37 (3.94%) were developing follicles. In experiment 1, there were
20 differences ($p < 0.05$) in the presence of pre-antral follicles in the inner regions (C1
21 41.6%, 470/1130), middle (C2 32.4%; 366/1130) and outer(C3 26% ; 294/1130) of
22 the equine ovary. These three regions differed when compared to each other,
23 although C1 region had the highest percentage of pre-antral follicles in relation to
24 others ($p < 0.05$). However, the C2 and C3 regions showed a higher percentage of
25 intact primordial follicles and developing ones than the C1 region ($p < 0.05$). In

1 experiment 2, the regions close to ovulation fossa (PFO1+PFO2 58.7%; 551/938)
2 had higher follicular concentration in relation to the distant region of ovulation fossa
3 (DFO3 + DFO4 41.3; 387/938; $p < 0.05$). However, DFO region showed a lower
4 proportion of degenerated primordial follicles and developing ones than the PFO
5 region, demonstrating greater presence of intact ovarian follicles ($p < 0.05$). This way,
6 the distribution of preantral follicles in the equine ovary occurred heterogeneously,
7 with larger amounts of preantral follicles in the inner and near regions of ovulation
8 fossa. This study suggests new concepts about the location of equine ovarian
9 follicles, contributing to the application of reproductive biotechnologies such as in
10 vitro culture.

11

12 **Keywords:** Mare, Ovarian follicles, Ovulation fossa, Follicular location, Ovarian
13 region.

1. INTRODUÇÃO

O ovário dos mamíferos é constituído por um *pool* folicular que contém milhares de folículos pré-antrais, dos quais cerca de 99,9% jamais atingirão a ovulação, devido ao processo de atresia folicular (MARSTRÖM et al., 2002). Esses folículos, na maioria das espécies localizam-se na porção externa do tecido ovariano, porém, para a espécie equina não se aplica esta definição, pois sugere-se que seus folículos podem ser encontrados na porção interna do ovário (CHARLESTON et al., 2007).

A contagem de folículos pré-antrais nos ovários mamíferos proporciona estimar a população folicular. Tal estudo é laborioso, já que todos os folículos presentes na extensão da região cortical devem ser contabilizados; desta forma, a maioria das investigações utilizam amostras representativas de tecido ovariano para esta análise, desconsiderando as investigações sobre delimitações das camadas ovarianas (cortical e medular) e distribuição folicular (SCHMIDT, 2003; STANSFIELD; NÖTHLING; ANSARI, 2011).

Na maioria das espécies domésticas e de produção já foram estudadas a localização e distribuição da população folicular ovariana. No entanto, alguns estudos atuais ainda constatarem peculiaridades e distinções em relação aos folículos pré-antrais nos mamíferos. Tais como na espécie canina, no qual constatarem diferença na quantidade de folículos pré-antrais entre os ovários direito e esquerdo (LUNARDON et al., 2015). Já na espécie bovina não foi observada distinção da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (SILVA-SANTOS et al., 2011).

1 Em relação à espécie equina, a distribuição regional dos folículos pré-antrais
2 no ovário equino não é conhecida. O tamanho do ovário equino, que possui
3 dimensões maiores que do bovino, pode contribuir para que ocorra uma distribuição
4 folicular irregular e pouca delimitação entre as camadas ovarianas. Outro fato notório
5 à se considerar é a baixa presença de folículos com cerca de 35.590 por ovário
6 (DRIANCOURT et al., 1982), visto que a espécie bovina apresenta 130.000 folículos
7 (ERICKSON, 1966).

8 Além disso, recentemente, estudos referentes ao cultivo folicular *in vitro*
9 destacaram a dificuldade na obtenção de folículos pré-antrais em fragmentos
10 ovarianos da espécie equina. Estes constataram quantidades irrisórias de folículos,
11 mesmo quando coletados da porção interna do ovário (ALVES et al., 2015; GOMES
12 et al., 2015). Desta forma, novas investigações concernentes a distribuição regional
13 de folículos pré-antrais no ovário equino poderão auxiliar no estudo da
14 foliculogênese e nortear a retirada de fragmentos ovarianos de uma região
15 específica, contribuindo para o sucesso de biotécnicas como o cultivo *in vitro* desses
16 folículos.

17 Portanto, o presente trabalho propõe duas investigações quanto à distribuição
18 de folículos pré-antrais no ovário equino: i) a presença e integridade desses folículos
19 na extensão das regiões interna, média e externa do ovário e ii) a presença e
20 integridade desses folículos nas regiões próximas e distantes da fossa ovulatória.

21

22 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

23

24 2.1 Obtenção dos ovários

1 Ovários (n=7) foram coletados a partir de éguas em anestro estacional
2 provenientes de abatedouro localizado a aproximadamente 40 km do laboratório de
3 Reprodução Animal (Reproa). A idade, condição corpórea e raça das éguas foram
4 desconhecidas. Os ovários foram armazenados e transportados em recipiente
5 térmico plástico à temperatura de 21° C na ausência de soluções tampões. No
6 laboratório cada ovário foi cuidadosamente dissecado com bisturi para remoção de
7 tecidos conectivos, seccionados no plano sagital e os que continham corpo lúteo
8 (CL) ou folículos antrais em abundância foram descartados.

9

10 *Experimento 1*

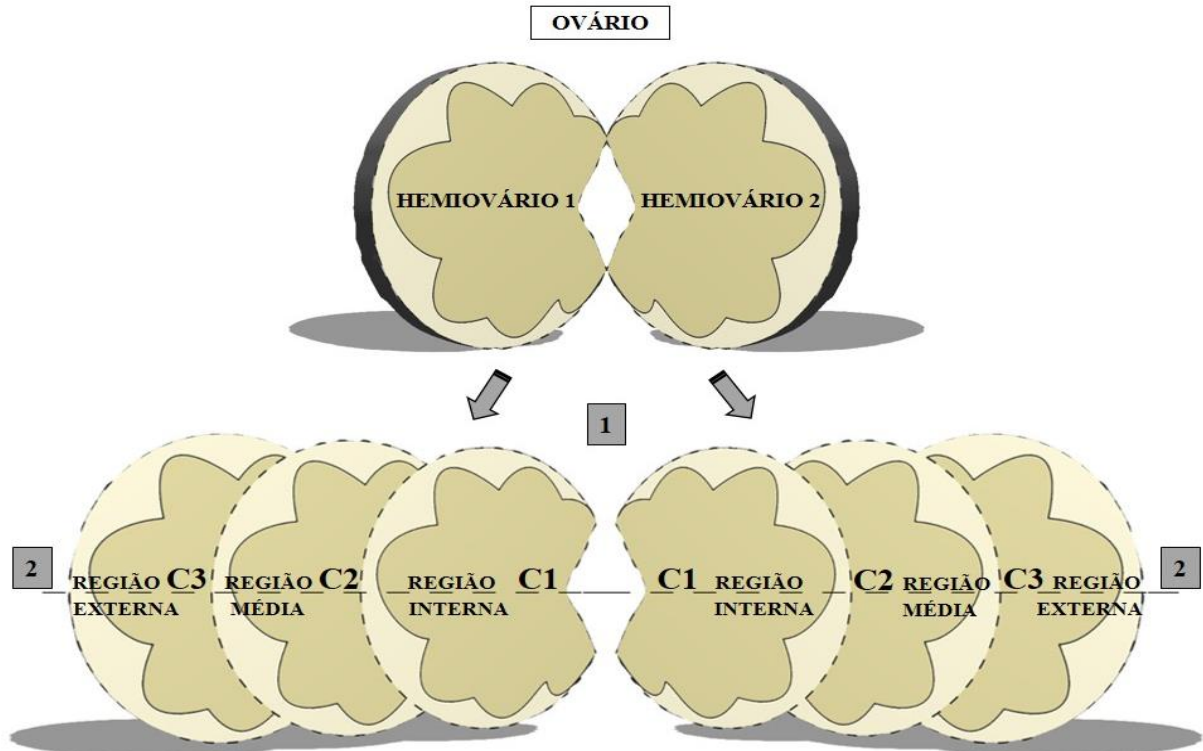
11

12 Ovários obtidos no abatedouro (n=3) foram utilizados para investigação da
13 distribuição regional dos folículos pré-antrais. O ovário inteiro foi utilizado, contudo,
14 foi necessária a fragmentação do tecido para adequar sua dimensão nas lâminas
15 histológicas. Assim, cada ovário foi submetido a um corte longitudinal realizado
16 sobre a curvatura maior do ovário para obtenção de dois hemiovários. Cada
17 hemiovário foi seccionado verticalmente em seis fragmentos, totalizando 12
18 fragmentos para cada ovário inteiro, medindo cerca de 1,5 x 0,5 x 0,5 cm.

19 Esses fragmentos foram delimitados em três regiões que contemplam a
20 extensão do ovário, nomeadas como: região mais interna do parênquima (C1),
21 região média (entre a região mais interna e a externa; C2) e o terceiro corte
22 contemplando a região mais externa (C3). Após cada região (C1, C2 e C3) foi
23 seccionada transversalmente para obtenção de dois fragmentos (Figura 8).

24

25



1 **Figura 8.** Ilustração demonstrativa das extensões ovarianas avaliadas referentes às
 2 regiões interna (C1), média (C2) e externa (C3) obtidas através de cortes verticais
 3 (1) e em seguida secções transversais para dividir cada região em dois fragmentos
 4 (2).

5
 10

11 *Experimento 2*

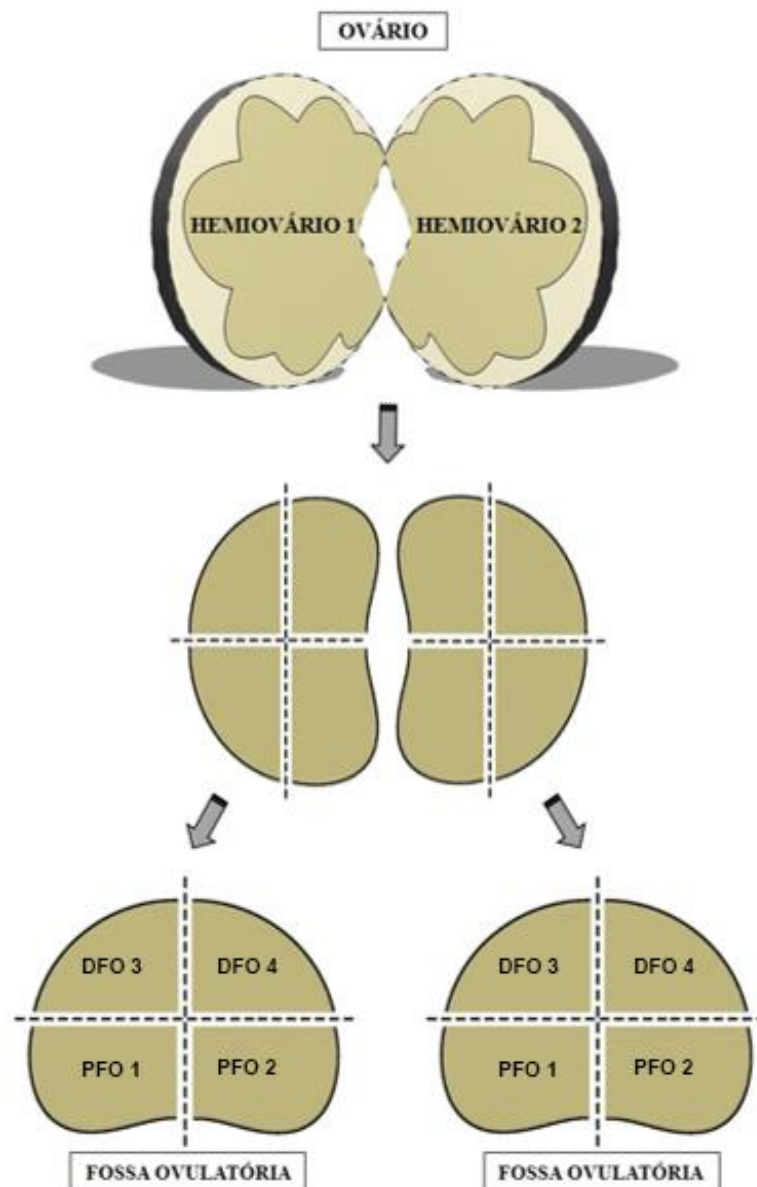
12

13 Do total de ovários obtidos no abatedouro, quatro foram utilizados para
 14 investigação quanto a distribuição dos folículos pré-antrais em relação à fossa
 15 ovulatória ovariana. Assim como no experimento 1, o ovário inteiro foi utilizado,
 16 porém fragmentado. Cada ovário foi submetido a um corte longitudinal realizado
 17 sobre a curvatura maior do ovário para obtenção de dois hemiovários. Cada
 18 hemiovário foi seccionado em quatro fragmentos simétricos, totalizando oito
 19 fragmentos para cada ovário inteiro, nos quais estes localizavam-se distantes ou
 20 próximos da fossa ovulatória. Os fragmentos referentes à curvatura menor do ovário

1 foram definidos como próximos da fossa ovulatória (PFO1+PFO2) e os fragmentos
2 que se localizavam na curvatura maior do ovário foram definidos como distantes da
3 fossa ovulatória (DFO3+DFO4; Figura 9).

4

5 **Figura 9.** Ilustração demonstrativa dos fragmentos ovarianos avaliados referentes às
6 regiões próximas (PFO1+PFO2) e distantes (DFO3+DFO4) da fossa ovulatória.



2.2 *Processamento histológico*

1

2

3 Os fragmentos de ambos os experimentos foram imediatamente fixados em
4 Carnoy por 12 horas, permaneceram no álcool 70 % por 24 horas, em seguida
5 desidratados em etanol, diafinizados em xilol, embebidos em parafina, cortados
6 sequencialmente na espessura de 5 µm para montagem de lâminas. Para cada
7 fragmento ovariano foram confeccionadas 25 lâminas com três cortes histológicos. A
8 coloração foi realizada com ácido periódico de Schiff e Hematoxilina. A leitura das
9 lâminas histológicas foram realizadas em microscópio óptico no aumento de 20 e
10 40x.

11

2.3 *Classificação dos folículos*

12

13
14 Os folículos foram classificados de acordo com os seguintes estágios de
15 desenvolvimento: (1) folículos primordiais (oócito rodeado por uma camada de
16 células da granulosa achatadas); (2) folículos em desenvolvimento, composto de
17 folículos primários (oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa
18 cuboide) e folículos secundários (oócito rodeado por mais do que uma camada
19 completa de células da granulosa cuboides; GOMES et al., 2015).

20

21 Os folículos também foram classificados como íntegros ou degenerados de
22 acordo com a morfologia do oócito e as células da granulosa. Os folículos
23 classificados como morfologicamente íntegros apresentavam oócitos intactos e
24 células da granulosa organizadas em camadas discretas, sem núcleos picnóticos.
25 Folículos degenerados foram definidos como folículos contendo um oócito com
núcleo picnótico e/ou um oócito rodeado por células da granulosa desorganizadas,

1 destacadas da membrana, com citoplasma retraído (ANDRADE et al., 2012; HAAG
2 et al., 2013; GOMES et al., 2015).

3

4 *2.4 Análise estatística*

5

6 As proporções de folículos primordiais e em desenvolvimento para cada
7 região avaliada (C1; C2; C3; PFO1+PFO2; DFO3+DFO4) dos experimentos foram
8 comparadas. Cada variável foi analisada quanto à normalidade de distribuição pelo
9 teste de Kolmogorov-Smirnov. O modelo estatístico foi não paramétrico,
10 empregando o teste exato de Fisher para comparar as percentagens de folículos
11 primordiais e em desenvolvimento entre as regiões ovarianas, além da integridade
12 folicular. O nível de significância foi $p \leq 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada
13 no programa estatístico Minitab® 16.1.1.

14

15 **3. RESULTADOS**

16

17 *Experimento 1*

18

19 Nesta investigação, foram avaliadas 900 lâminas, contendo 2.700 cortes
20 histológicos e 36 fragmentos ovarianos obtidos de três éguas. Os folículos
21 encontrados estavam presentes em apenas 12,4 % (355/2.700) dos fragmentos
22 avaliados. Dos 1.130 folículos avaliados, 1.054 (93,3 %) eram folículos primordiais,
23 76 (6,7 %) estavam em desenvolvimento e 93,71 % do total eram morfologicamente
24 íntegros.

1 Houve diferença ($p < 0,05$) quanto a presença de folículos pré-antrais nas
 2 regiões interna (C1; 41,6 %; 470/1130), média (C2; 32,4 %; 366/1130) e externa (C3;
 3 26 %; 294/1130) do ovário equino. Estas três regiões diferiram quando comparadas
 4 entre si, assim a região C1 apresentou maior percentagem de folículos pré-antrais,
 5 em seguida C2 e por último C3 ($p < 0,05$; Tabela 3).

6 A proporção da quantidade de folículos primordiais encontrada em cada
 7 região foram equivalentes, porém quando efetuamos comparação entre folículos
 8 primordiais e em desenvolvimento em relação a integridade folicular foi encontrado
 9 diferença estatística. A região C1 apresentou maior quantidade de folículos
 10 degenerados que as regiões C2 e C3 ($p < 0,05$; Tabela 4).

11

12 **Tabela 3.** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões interna
 13 (C1), média (C2) e externa (C3) com a proporção de folículos íntegros e
 14 degenerados totais; $p < 0,05$).

Região	Total	Íntegros	Degenerados
ovariana	%(folículos)	%(folículos)	%(folículos)
Interna (C1)	41,6 ^a (470)	91,28 ^{b, A} (429/470)	8,72 ^{a, B} (41/470)
Média (C2)	32,4 ^b (366)	95,08 ^{a, A} (348/366)	4,92 ^{b, B} (18/366)
Externa (C3)	26,0 ^c (294)	95,92 ^{a, A} (282/294)	4,08 ^{b, B} (12/294)
Total	100 (1130)	93,7 ^A (1059/1130)	6,3 ^B (71/1130)

15 Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) e dentro de uma mesma coluna
 16 diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre as regiões ovarianas (interna, média e externa).
 17 Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B) e dentro de uma mesma linha
 18 diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre a proporção de folículos primordiais e em
 19 desenvolvimento.

Tabela 4. Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões interna (C1), média (C2) e externa (C3) com a proporção de folículos íntegros (primordiais e em desenvolvimento) e degenerados (primordiais e desenvolvimento; $p < 0,05$).

Região ovariana	Total % (N° folículos)	Folículos Íntegros				Folículos Degenerados			
		Primordial		Desenvolvimento		Primordial		Desenvolvimento	
		%, (N° folículos)		%, (N° folículos)		%, (N° folículos)		%, (N° folículos)	
Interna (C1)	41,59 ^a (470)	88,01 ^{a, A}	414	3,19 ^{a, C}	15	7,06 ^{a, B}	33	1,74 ^{a, C}	8
Média (C2)	32,39 ^b (366)	89,07 ^{a, A}	326	6,02 ^{a, B}	22	2,18 ^{b, C}	8	2,73 ^{a, C}	10
Externa (C3)	26,02 ^c (294)	90,47 ^{a, A}	266	5,44 ^{a, B}	16	2,38 ^{b, BC}	7	1,71 ^{a, C}	5
Total	100 (1130)	89,1	1006	4,7	53	4,2	48	2,0	23

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre as regiões ovarianas (interna, média e externa).

Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B, C) e dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre a proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento.

1 *Experimento 2*

2

3 Nesta investigação, foram avaliadas 800 lâminas, contendo 2.400 cortes
4 histológicos de 32 fragmentos ovarianos obtidos de quatro éguas. Os folículos
5 encontrados estavam presentes em apenas 10,3 % (247/2.400) dos fragmentos
6 avaliados. Dos 938 folículos avaliados, 894 (95,30%) eram folículos primordiais, 44
7 (4,7%) estavam em desenvolvimento, e 96,05% do total eram morfologicamente
8 normais.

9 Em relação à localização regional dos folículos pré-antrais ovarianos,
10 constatamos que as regiões próximas à fossa ovulatória (PFO1+PFO2; 58,7 %;
11 551/938) apresentaram maior concentração folicular em relação à região distante da
12 fossa ovulatória (DFO3+DFO4; 41,3 %; 387/938; $p < 0,05$; Tabela 5). Em relação a
13 proporção da percentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento
14 encontrada em cada região, estas foram equivalentes, no entanto houve diferença
15 avaliando a comparação entre a proporção dos folículos primordiais e em
16 desenvolvimento quanto a integridade. A região DFO apresentou menor proporção
17 de folículos degenerados primordiais e em desenvolvimento que a região PFO,
18 demonstrando maior presença de folículos ovarianos íntegros ($p < 0,05$; Tabela 6).

19 Nesta investigação notamos ovários que apresentaram maior quantidade de
20 folículos pré-antrais em relação aos demais, fato este considerado atípico para
21 espécie equina. Ainda, evidenciamos alta densidade de folículos, além do
22 agrupamento destes no tecido ovariano. O agrupamento folicular foi definido
23 considerando número maior que dois folículos pré-antrais circunvizinhos e/ou muito
24 próximos. Estes continham folículos primordiais, nos quais grande parte mostraram-
25 se em crescimento com alteração morfológica das células da granulosa. Os folículos

1 primordiais em crescimento possuíam as células da granulosa com formato
 2 achatado menos acentuado e diâmetro maior e mais facilmente visíveis. Os folículos
 3 pré-antrais em desenvolvimento (primários e secundários) não estavam presentes
 4 em nenhum dos agrupamentos observados (Figura 10).

5

6 **Tabela 5.** Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos em regiões próximas
 7 (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória e a proporção quanto à integridade
 8 folicular ($p < 0,05$).

Região	Total	Íntegros	Degenerados
ovariana	%(folículos)	%(folículos)	%(folículos)
PFO	58,7 ^a (551)	95,82 ^{a, A} (528/551)	4,17 ^{a, B} (23/551)
DFO	41,3 ^b (387)	96,38 ^{a, A} (373/387)	3,61 ^{a, B} (14/387)
Total	100 (938)	96,1 ^A (901/938)	3,9 ^B (37/938)

9 Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) e dentro de uma mesma coluna
 10 diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre as regiões ovarianas (próxima e distante da fossa
 11 ovulatória).

12 Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B) e dentro de uma mesma linha
 13 diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre a proporção de folículos primordiais e em
 14 desenvolvimento.

15

16

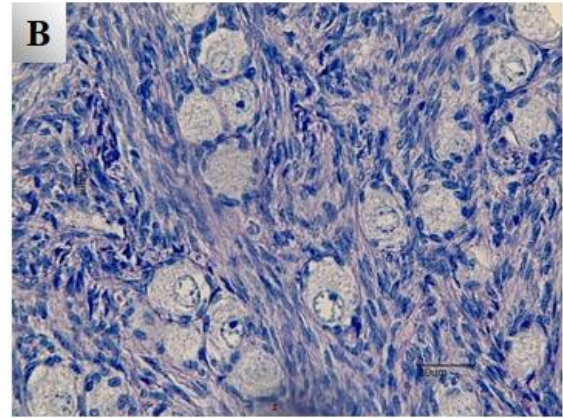
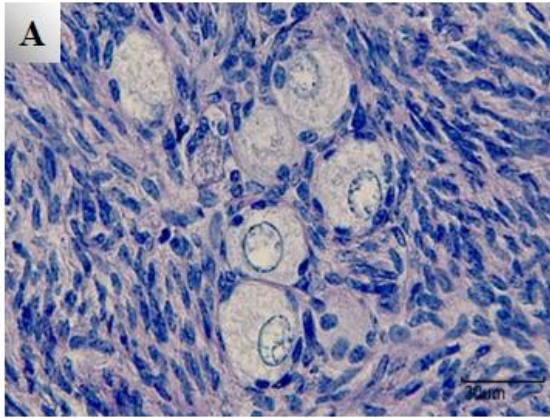
17

18

19

20

- 1 **Figura 10.** Agrupamento de folículos pré-antrais primordiais da espécie equina (A e
- 2 B). Coloração de PAS e Hematoxilina. Aumento 40x e 20x.



3

Tabela 6. Percentagens de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões próximas (PFO) e distantes (DFO) da fossa ovulatória com a proporção de folículos íntegros (primordiais e em desenvolvimento) e degenerados (primordiais e desenvolvimento; $p < 0,05$).

Região ovariana	Total		Folículos Íntegros		Folículos Degenerados					
	% (N° folículos)		Primordial %, (N° folículos)	Desenvolvimento %, (N° folículos)	Primordial %, (N° folículos)	Desenvolvimento %, (N° folículos)				
Próxima da FO (PFO)	58,7 ^a	551/938	91,83 ^{a,A}	506/551	3,99 ^{a,B}	22/551	2,55 ^{a,BC}	14/551	1,63 ^{a,C}	9/551
Distante da FO (DFO)	41,3 ^b	387/938	93,79 ^{a,A}	363/387	2,58 ^{a,B}	10/387	2,84 ^{a,B}	11/387	0,79 ^{a,B}	3/387
Total	100	938/938	92,64 ^A	869/938	3,41 ^B	32/938	2,66 ^B	25/938	1,29 ^B	12/938

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre as regiões ovarianas (próxima e distante da fossa ovulatória).

Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B, C) e dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre a proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento.

1 **4. DISCUSSÃO**

2
3 Este estudo constatou que a distribuição dos folículos pré-antrais equinos
4 localizaram-se em maior quantidade nas regiões interna e próxima da fossa
5 ovulatória. Nosso resultado pode estar relacionado com a origem da fossa ovulatória
6 provinda da região ovariana mais interna, referente à borda mais ventral e côncava
7 do ovário equino. Após a formação da fossa ovulatória, esta pode ser identificada na
8 curvatura menor do ovário e também é o local onde ocorre a ovulação nesta espécie
9 (EVANS et al., 2007).

10 Contudo a distribuição regional dos folículos ovarianos da espécie equina era
11 desconhecida e alguns fatores podem ter dificultado as investigações deste âmbito,
12 tais como a falta de material para estudo, já que os ovários de éguas provêm de
13 escassos abatedouros, de fêmeas ovariectomizadas ou que vieram a óbito (GOMES
14 et al., 2015). Além disso procedimentos como a biópsia ovariana (HAAG et al., 2013)
15 não se adequam ao estudo sobre distribuição folicular, visto que os fragmentos
16 coletados apresentam pouca representatividade da massa total do ovário. E por
17 último, considera-se laborioso o estudo sobre a distribuição regional folicular, já que
18 todos os folículos presentes nos fragmentos de cada ovário investigado devem ser
19 contabilizados; desta forma, há poucos estudos que abrangem a distribuição folicular
20 nas espécies mamíferas (SCHMIDT, 2003; STANSFIELD; NÖTHLING; ANSARI,
21 2011).

22 Nosso estudo também identificou pouca delimitação entre as camadas do
23 ovário equino referentes as regiões cortical (interna) e medular (externa). As regiões
24 investigadas denominadas de região média (C2; 32,4 %; 366/1130), externa (C3; 26
25 %; 294/1130) e distante da fossa ovulatória (DFO; 41,3 %; 387/938) apresentaram

1 menor presença de folículos pré-antrais totais que as regiões interna (C1; 41,6 %;
2 470/1130) e próxima da fossa ovulatória (PFO; 58,7 %; 551/938), entretanto
3 consideramos relevante a presença e proporção numérica dos folículos encontrados
4 nos fragmentos ovarianos que abrangeram à região medular. Além do apresentado,
5 as regiões média, externa e distante da fossa ovulatória (menos concentração de
6 folículos) demonstraram obter maior proporção de folículos íntegros que as demais
7 regiões com maior concentração de folículos pré-antrais. Tal fato pode estar
8 relacionado com a maior interação de folículos circunvizinhos encontrados nas
9 regiões C1 e PFO e a produção de fatores parácrinos como: hormônios, fatores de
10 crescimento, gases dentre outros, que possam repercutir em degeneração folicular
11 (ARAUJO et al., 2014).

12 A distribuição irregular ou heterogênea dos folículos ovarianos equinos
13 apresentada neste estudo contradiz conceitos didáticos que delimitam a presença
14 destes apenas na região cortical (interna; GINTHER, 1992). Dentre as espécies
15 mamíferas, o ovário equino se destaca pelo seu tamanho (GONZÁLEZ et al., 2015),
16 além do diâmetro dos folículos pré-ovulatórios, medindo cerca de 45 mm (EVANS et
17 al., 2007). Assim, o tamanho do ovário equino pode contribuir para que ocorra uma
18 distribuição folicular além da delimitação da camada cortical (interna).

19 Os dois experimentos deste trabalho apresentaram alto percentual de
20 integridade folicular utilizando o armazenamento dos ovários equinos em recipiente
21 à temperatura ambiente (21° C) e ausência de soluções tampões para o transporte
22 (abatedouro distante à 40 Km do laboratório). Nestas condições em que foram
23 realizados nossos experimentos obtivemos resultados que corroboram com o
24 encontrado por Haag et al. (2013) e Alves et al. (2015) utilizando o procedimento de
25 biópsia ovariana.

1 Em pesquisas recentes relacionadas à biotécnica de cultivo *in vitro* de
2 folículos pré-antrais equinos, constatou-se dificuldade em encontrar estes inclusos
3 em fragmentos ovarianos (ALVES et al., 2015; GOMES et al., 2015). A espécie
4 equina apresenta baixa densidade folicular possuindo uma média 35.590 folículos
5 primordiais por ovário (DRIANCOURT et al., 1982). Tal fato contrasta com a espécie
6 bovina com 130.000 folículos primordiais (ERICKSON, 1966), ovina com 77.000
7 folículos primordiais (LAND, 1970) e caprina com cerca de 26.613 folículos
8 primordiais (LUCCI et al., 1999). A vasta abrangência para coleta dos fragmentos
9 ovarianos devido as dimensões do ovário equino pode restringir o sucesso do cultivo
10 de folículos pré-antrais *in vitro*. Portanto, este primeiro estudo sobre distribuição
11 regional de folículos pré-antrais equinos apresenta informações relevantes à
12 comunidade científica quanto a localização e delimitação pouco evidente das
13 camadas ovarianas, além disso possui aplicabilidade prática, pois contribui a nortear
14 a retirada de fragmentos do ovário para biotécnicas como cultivo folicular *in vitro* de
15 regiões com maior concentração ou maior integridade de folículos pré-antrais.

16

17 **5. CONCLUSÃO**

18

19 Este estudo sugere novos conceitos quanto a localização dos folículos
20 ovarianos na espécie equina, contribuindo para o sucesso de biotécnicas
21 reprodutivas como o cultivo folicular *in vitro*. O conhecimento sobre a distribuição
22 folicular do ovário equino contribui para direcionar a retirada de fragmentos
23 ovarianos das regiões que possuam maior presença de folículos pré-antrais como a
24 região interna e próxima da fossa ovulatória, além da maior presença de folículos
25 íntegros nas regiões média, externa e distante da fossa ovulatória.

1 REFERÊNCIAS

- 2
3 ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ROCHA, C.D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R.F.F.;
4 GASTAL, M.O.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI,
5 M.L.; GASTAL, E.L. Number and density of equine preantral follicles in diferente
6 ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v.83, p.1048-1055, 2015.
7
8 ANDRADE, E.R.; MARCONDES, S.M.; ALFIERI, A.A.; FREDERICO, R.L.B.A.P.;
9 FIGUEIREDO, J. R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the
10 culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p.1104-13, 2012.
11
12 CHARLESTON, J.S.; HANSEN, K.R.; THYER, A.C.; CHARLESTON, L.B.;
13 GOUGEON, A.; SIEBERT, J.R.; SOULES, M.R.; KLEIN, N.A. Estimating human
14 ovarian non-growing follicle number: the application of modern stereology techniques
15 to an old problem. **Human Reproduction**, v.22, n.8, p.2103-2110, 2007.
16
17 DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J.C.; PALMER, E. Ovarian
18 follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction Nutrition**
19 **Development**, v.2, p.1035-47, 1982.
20
21 ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary.
22 **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.
23
24 GOMES, R.G.; ANDRADE, E.R.; LISBOA, L.A.; CIQUINI, A.; BARREIROS, T.R.R.;
25 FONSECA, N.A.N.; SENEDA, M.M. Effect of holding medium, temperature and time
26 on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season.
27 **Theriogenology**, v.78, p.731-736, 2012.
28
29 GOMES, R.G., LISBOA, L.A., SILVA, C.B.; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA,
30 R.L.; GONZALEZ, S.M.; SANTOS, M.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.S.R.;
31 SENEDA, M.M. Improvement of development of equine preantral follicles after six
32 days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v.84,
33 p.750-55, 2015.
34
35 HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.;
36 GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro
37 culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method.
38 **Theriogenology**, v.79, n.6, p.1-7, 2013.
39
40 LAND, R.B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish
41 Landrace cross blackface and Welsh sheep. **Journal of Reproduction Fertility**,
42 v.21, p.517-521, 1970.
43
44 LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.;
45 SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B. Study of preantral follicle population in situ and
46 after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages.
47 **Animal Reproduction Science**, v.56, p.223-236, 1999.

- 1 LUNARDON, N.T.; SILVA-SANTOS, K.C.; JUSTINO, R.C.; DESSUNTI, G.T.;
2 SENEDA, M.M.; MARTINS, M.I.M. Population estimate of the preantral follicles and
3 frequency of multiocyte follicles in prepubertal and adult bitches. **Theriogenology**,
4 v.83, p.1015-1020, 2015.
5
- 6 MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H.
7 Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation.
8 **Reproduction**, v.123, p.23-30, 2002.
9
- 10 SCHMIDT, K.L.T. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of
11 cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human
12 ovaries. **Human Reproduction**, v.18, n.6, p.1158-1164, 2003.
13
- 14 SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE,
15 E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate
16 of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos*
17 *taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.
18
- 19 STANSFIELD, F.J.; NÖTHLING, J.O.; ANSARI, T. The distribution of small preantral
20 follicles within the ovaries of prepubertal African elephants (*Loxodonta africana*).
21 **Animal Reproduction Science**, v.129, p.96-103, 2011.
22
- 23 SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Distribution, morphology and ultrastructure of
24 preantral follicles in the ovary of the mare. **Havemeyer Found Monogr Ser**, v.5,
25 p.33-35, 2008.

6. CONCLUSÕES

- O ovário equino possui maior presença de folículos pré-antrais distribuídos nas regiões interna e próxima a fossa ovulatória;
- Constatou-se maior presença de folículos íntegros nas regiões com menor concentração folicular; regiões média, externa e distante da fossa ovulatória;
- Evidenciamos pouca delimitação entre as camadas denominadas cortical (interna) e medular (externa), constatando a presença de folículos pré-antrais em fragmentos ovarianos que abrangeram a região medular;
- A distribuição folicular do ovário equino poderá direcionar a retirada de fragmentos ovarianos para cultivo *in vitro* das regiões que possuam maior presença de folículos pré-antrais como a região interna e próxima da fossa ovulatória, além da maior presença de folículos íntegros encontrados nas regiões média, externa e distante da fossa ovulatória.

7. APÊNDICES

Os seguintes artigos anexados foram realizados durante o período do mestrado.

1) GONZÁLEZ, S.M.; ROBERTA G. GOMES; SOUZA, A.K.; SILVA, C.B.; SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Evidences of regular estrous cycles in mules and successful use of these animals as recipients for donkey embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.35, p.869-872, 2015.

2) GOMES, R.G., LISBOA, L.A., SILVA, C.B.; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA, R.L.; GONZALEZ, S.M.; SANTOS, M.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Improvement of development of equine preantral follicles after six days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v.84, p.750-55, 2015.

3) GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; SILVA-SANTOS, K.C.; DI SANTIS, G.W.; SENEDA, M.M. Equine antral follicle containing cartilage and bone: ovarian teratoma. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.13, p.41-44, 2015.

4) MOROTTI, F.; BARREIROS, T.R.R.; MACHADO, F.Z.; GONZÁLEZ, S.M.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? **Animal Reproduction**, v.12, p.479-486, 2015.

5) GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.G.; BÚFALO, I.; MACHADO, F.Z.; BUENO, J.V.R.; SCARPIN, L.C.; BERGAMO, L.Z.; SILVA-SANTOS, K.C.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Recovery of equine oocytes by scraping of the follicular wall with different specifications of needles and morphological analysis of cumulus oophorus. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.6, p.433-4340, 2015.

6) GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; MACHADO, F.Z.; SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Granulosa cells tumor in mules. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.13, p.91-95, 2015.

7) MARINO, P.C.; SILVA, C.B.; GONZALEZ, S.M.; REWAY, A.P.; ALMEIDA, A.L.; BIANCHINI, T.P.; FERNANDES, T.M.; GOMES, R.G.; LISBOA, J.A.N.; SENEDA, M.M. Biomarcadores fisiológicos de ovelhas (*Ovis aries*) mestiças durante o periparto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.3, p.159-164, 2014.

8) BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.G.; BERGAMO, L.Z.; COSTA, C.B.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.7, 2015 (aceito/em prelo).

9) OLIVEIRA, R.L.; SILVA-SANTOS, K.C.; GONZÁLEZ, S.M.; MACHADO, F.Z.; SILVA, C.B.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; SENEDA, M.M. Proliferative activity of oocytes in multi-oocyte follicles of bovine ovary (submetido **Animal Reproduction**-2015).